

**(WO/2002/072594) BRANCHED CYCLIC TETRASSACHARIDE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND USE**[Biblio. Data](#) [Description](#) [Claims](#) [National Phase](#) [Notices](#) [Documents](#)

## Latest bibliographic data on file with the International Bureau

Pub. No.: WO/2002/072594 International Application No.: PCT/JP2002/002213  
 Publication Date: 19.09.2002 International Filing Date: 08.03.2002

IPC: A61K 47/26 (2006.01), A61K 47/40 (2006.01), A61K 9/20 (2006.01), C07H 3/06 (2006.01), C12P 19/18 (2006.01)

Applicants: KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO [JP/JP]; 2-3, Shimoishii 1-chome, Okayama-shi, Okayama 700-0907 (JP) *(All Except US)*.  
 AGA, Hajime [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 HIGASHIYAMA, Takanobu [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 WATANABE, Hikaru [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 SONODA, Tomohiko [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 KUBOTA, Michio [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.

Inventors: AGA, Hajime; (JP).  
 HIGASHIYAMA, Takanobu; (JP).  
 WATANABE, Hikaru; (JP).  
 SONODA, Tomohiko; (JP).  
 KUBOTA, Michio; (JP).

Priority Data: 2001-67282 09 03 2001 JP

Title: BRANCHED CYCLIC TETRASSACHARIDE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND USE

Abstract: A novel glycosyl derivative which is a cyclic tetrassacharide represented by cyclo{\$m(7)6}\$-Sg(a)-D-glucopyranosyl-(1\$m(7)3)\$-Sg(a)-D-glucopyranosyl-(1\$m(7)6)\$-Sg(a)-D-glucopyranosyl-(1\$m(7)3)\$-Sg(a)-D-glucopyranosyl-(1\$m(7)7)}\$. It is a branched cyclic tetrassacharide in which one or more hydrogen atoms of the hydroxyl groups have been replaced with an optionally substituted glycosyl group (provided that when the hydrogen atom of the hydroxyl group bonded to the 6-position carbon in each glucopyranosyl is the only hydrogen atom which has been replaced, the substituent is a group selected among glycosyl groups excluding D-glucosyl).

Designated JP, US.  
 States: European Patent Office (EPO) (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Publication Language: Japanese (JA)  
 Filing Language: Japanese (JA)

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 9 月 19 日 (19.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/072594 A1

(51) 国際特許分類: C07H /06, C08B 37/00, C12P 19/00, A23L 1/30, A61K 47/26, 7/00

[JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/02213

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2002 年 3 月 8 日 (08.03.2002)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿賀 創 (AGA, Hajime) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 東山 隆信 (HIGASHIYAMA, Takanobu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 渡辺 光 (WATANABE, Hikaru) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 園田 智彦 (SONODA, Tomohiko) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 久保田 倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-67282 2001 年 3 月 9 日 (09.03.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO)

[続葉有]

(54) Title: BRANCHED CYCLIC TETRASSACHARIDE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND USE

(54) 発明の名称: 分岐環状四糖とその製造方法ならびに用途

(57) Abstract: A novel glycosyl derivative which is a cyclic tetrassacharide represented by cyclo{→6)-α-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-(1→}. It is a branched cyclic tetrassacharide in which one or more hydrogen atoms of the hydroxyl groups have been replaced with an optionally substituted glycosyl group (provided that when the hydrogen atom of the hydroxyl group bonded to the 6-position carbon in each glucopyranosyl is the only hydrogen atom which has been replaced, the substituent is a group selected among glycosyl groups excluding D-glucosyl).

(57) 要約:

サイクロ {→6) - α - D - グルコピラノシル - (1→3) - α - D - グルコピラノシル - (1→6) - α - D - グルコピラノシル - (1→3) - α - D - グルコピラノシル - (1→} で表される環状四糖の新規なグリコシル誘導体を提供することを課題とし、環状四糖の水酸基における水素原子の 1 個又は 2 個以上が置換基を有することのあるグリコシル基で置換された分岐環状四糖 (ただし、該水素原子のうちの、6 位の炭素に結合した水酸基における水素原子の 1 個のみが置換されている場合、該置換基は D - グルコシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。) を提供することにより解決する。



WO 02/072594 A1



(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

## 分岐環状四糖とその製造方法ならびに用途

## 5 技術分野

本発明は、新規な分岐環状四糖に関するものであり、詳細には、サイクロ { $\rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow$ ) で表される環状四糖のグリコシル誘導体である新規な分岐環状四糖とその製造方法ならびに用途に関するものである。

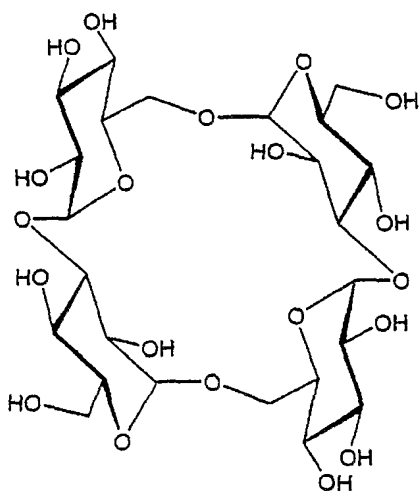
## 背景技術

グルコースを構成糖とする環状糖質としては、6乃至8分子のグルコースが $\alpha$ -1, 4グリコシル結合で連結して環状構造を形成している $\alpha$ -、 $\beta$ -及び $\gamma$ -シクロデキストリンが従来からよく知られている。これらのシクロデキストリンは、還元力を示さない、呈味を示さない、疎水性物質を包接するなどの特性を有し、これらの特性を生かして、現在、諸種の分野で利用が進んでいる。また、シクロデキストリンの物性の改善や、シクロデキストリンへの新規な機能の付与などを旨とした研究も盛んに進められている。例えば、特開平6-9708号公報、特開平6-14789号公報、特開平6-16705号公報、特開平6-298806号公報、特開平10-25305号公報などにはシクロデキス

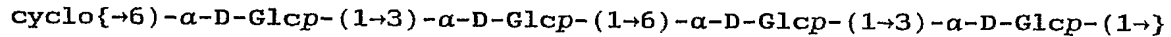
トリンにグルコシル基、ガラクトシル基、マンノシル基、グルコサミニル基、N-アセチルグルコサミニル基などのグリコシル基を結合させて分岐構造をもたせた分岐シクロデキストリンとその製造方法や用途が種々提案されている。

- 5 一方、比較的近年報告された環状糖質としては、グレゴリー・エル・コテら、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第226巻、641乃至648頁（1994年）に記載されている、グルコースが $\alpha-1, 3$ 及び $\alpha-1, 6$ 結合で交互に連結した環状四糖がある。この環状四糖の構造は、原子どうしの結合様式を表す化学式A、
- 10 ならびに、グルコシル基どうしの結合様式を表す化学式Bに示すとおりである。なお、サイクロ { $\rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) は、化学式A及びBと同じく上記環状四糖を意味するものである。本明細書を通じて
- 15 、単に「環状四糖」という場合、この環状四糖を意味するものとする。

化学式A:



化学式B:



上記のコテらの論文には、グルコース残基が $\alpha-1, 3$ 結合及び $\alpha-1, 6$ 結合で交互に連結した多糖アルテルナンに加水分解酵素アルテルナナーゼを作用させることにより環状四糖が生成することが報告されている。この報告を契機として、環状四糖に対しても、シクロデキストリンと同様に、あるいはそれ以上に多方面で利用されることに期待がもたれ始めることとなった。しかしながら、この論文に記載された方法の場合、原料たるアルテルナンが入手容易ではなく、しかも、該原料からの環状四糖の生成率が工業的観点からすれば十分ではないことなどから、この方法は、環状四糖の工業的製造方法に有利に利用できるといえるものではなかった。

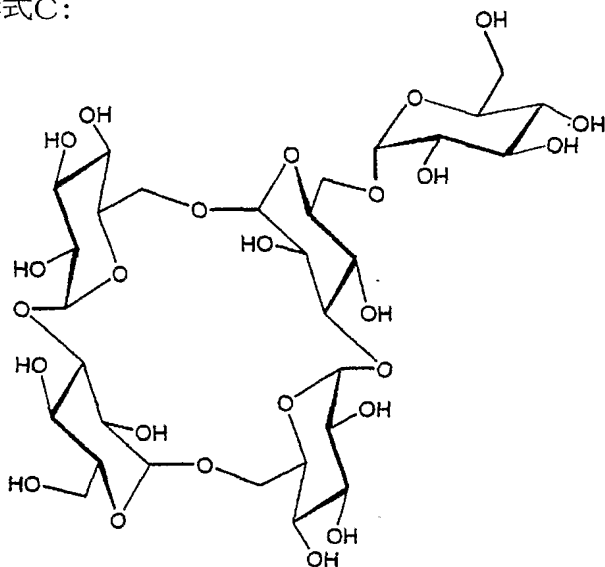
先に、同じ特許出願人は、特願2000-149484号ならびにこの特許出願を基礎とする優先権主張出願である特願2000-229557号（国際公開番号第WO 01/90338 A1号）の明細書に、非還元末端にイソマルトシル基を有し、非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質（以下、「 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質」という場合がある。）に作用して環状四糖を生成する新規酵素である $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を、また、特願2000-233364号ならびにこの特許出願を基礎とする優先権主張出願である特願2000-234937号（国際公開番号第WO 02/10361 A1号）の明細書に、グルコース重合度が3以上のマルトオリゴ糖に作用して $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を生成する新規酵素である $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を

開示した。そして、特願 2 0 0 0 - 2 3 3 3 6 4 号ならびに特願 2 0 0 0 - 2 3 4 9 3 7 号（国際公開番号 WO 0 2 / 1 0 3 6 1 A 1 号）の明細書においては、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせる用いることにより、食品製造用原料として汎用されている澱粉から環状四糖を主産物として生成させる方法を提案した。この提案により環状四糖の工業的製造への道が拓かれた。

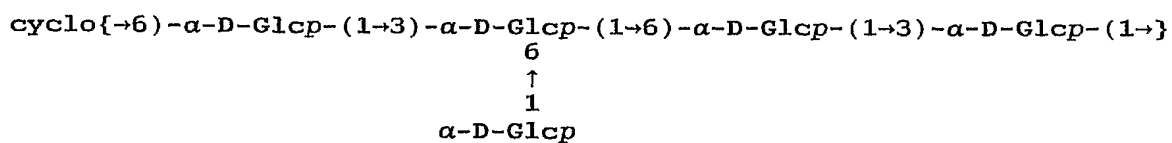
このように環状四糖に関する研究は近年始まったばかりという状況であり、未知の機能の解明や新規な用途の開発など、今後の研究の進展に大いに期待がもたれる。一方、環状四糖のグリコシル誘導体に関しては、上記のとおり環状四糖が現在までに公知であったとはいえ、その入手が必ずしも容易ではなかったことなどから、該誘導体の製造を主たる目的とした研究は現在のところ皆無である。唯一、化学式 C で示される 6- $\alpha$ -グルコピラノシル誘導体が、アルテルナンへのアルテルナナーゼの作用において極微量生成する副産物として単離・同定されたことが、上記のコテらの論文に記載されているのみである。なお、因みに、この 6- $\alpha$ -グルコピラノシル誘導体の構造をグルコシル基どうしの結合様式で表す化学式は、化学式 D に示すとおりである。

5

化学式C:



化学式D:



シクロデキストリンの場合と同様に、環状四糖についてもグリコシル誘導体が多種に亙って提供されれば、それぞれについての特性の解析を  
 5 とおして、環状四糖の用途開発に有用な知見がもたらされるとともに、  
 環状四糖の物性・機能を改良ないしは改変した新規糖質の用途開発にも  
 大きく貢献できるものと考えられる。

#### 発明の開示

- 10 斯かる状況に鑑み、本発明の課題は、第一に環状四糖の新規なグリコシル誘導体を提供することにある、第二に該グリコシル誘導体の製造方法を提供することにある、第三に該グリコシル誘導体の用途を提供することにある。



上記の課題を解決するため、本発明者等は、先ずはじめに、澱粉部分分解物に $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させて環状四糖を生成させる本発明者等が確立した反応において、環状四糖の関連糖質が副生成することを見出し、これらの副生成物の単離と同定を試みた。その結果、これらはいずれも環状四糖の新規なグリコシル誘導体であることが確認された。引き続き、上記の両酵素による反応で調製した環状四糖を用いて、上記の両酵素ならびに公知の糖質関連酵素を用いて、諸種のグリコシル基供与体の共存下、酵素反応を行った。その結果、上記の両酵素や、シクロマルトデキストリン

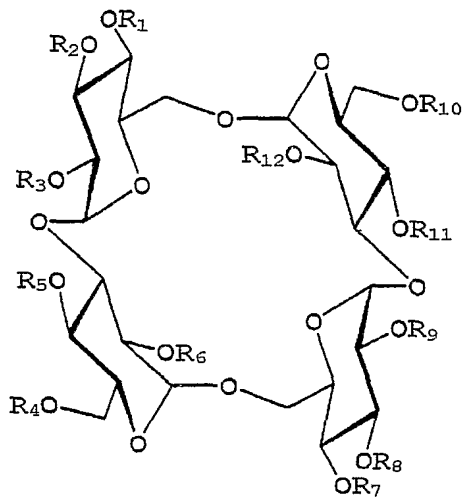
5 10 グルカノトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、リゾチームやその他の糖転移酵素、糖加水分解、糖加リン酸分解酵素などの糖質関連酵素を用いることにより、新規なグリコシル誘導体が極めて多岐にわたって得られることが見出された。そして、以上のようにして得られた環状四糖のグリコシル誘導体を単離し、それらの性

15 状を調べたところ、飲食品、化粧品、医薬品などの諸分野で有利に利用できることも確認された。本発明は、本発明者等による全く独自の以上の知見に基づいて為されたものである。

すなわち、本発明は、上記第一の課題を、環状四糖のグリコシル誘導体であって、一般式 1 で表される構造を有する分岐環状四糖を提供することにより解決するものである。

20

一般式1:



一般式 1 において、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ の全てが水素原子であることはなく、また、 $R_4$ 及び $R_{10}$ のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である $R_4$ 又は $R_{10}$ はD-グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。

また、本発明は、上記第二の課題を、環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用する製造方法であって、該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて本発明の分岐環状四糖を生成させる工程と、生成した分岐環状四糖を採取する工程とを含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法を提供することにより解決するものである。

さらに、本発明は、上記第三の課題を、上記の本発明の分岐環状四糖を含んでなる、飲食物、化粧品、医薬品などとしての組成物を提供することにより解決するものである。

## 図面の簡単な説明

第 1 図は、環状四糖の H P L C によるクロマトグラムである。

第 2 図は、環状四糖の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルである。

第 3 図破、環状四糖の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

5 第 4 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 1）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 5 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 3）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

10 第 6 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 4）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 7 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 5）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

15 第 8 a 図、第 8 b 図はそれぞれ、環状四糖と  $\alpha$ -シクロデキストリンの混合液に C G T a s e を作用させた反応液の H P L C によるクロマトグラム（a）と、該 C G T a s e 作用後にグルコアミラーゼを作用させた反応液の H P L C によるクロマトグラム（b）である。

第 9 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 2）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

20 第 10 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 6）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 11 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 8）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 12 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 7）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

25 第 13 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 9）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 1 4 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 1 0）の $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

第 1 5 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 1）の結晶の X 線回折図形である。

5 第 1 6 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 2）の結晶の X 線回折図形である。

第 1 7 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 3）の結晶の X 線回折図形である。

10 第 1 8 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 6）の結晶の X 線回折図形である。

第 1 9 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 7）の結晶の X 線回折図形である。

第 2 0 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 1）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

15 第 2 1 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 2）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

第 2 2 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 3）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

20 第 2 3 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 6）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

第 2 4 図は、本発明の分岐環状四糖（化学式 7）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

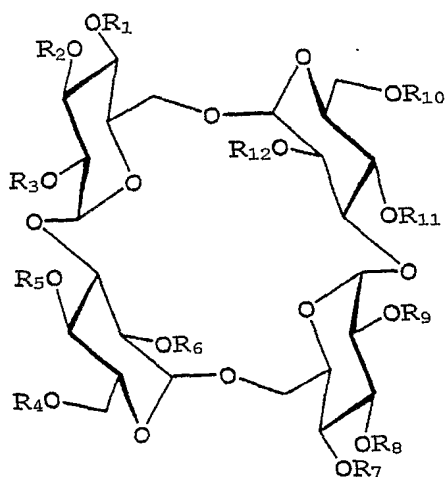
発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明の実施の形態を個々に詳述する。

# 1. 分岐環状四糖

本発明が提供する新規分岐環状四糖は、一般式 1 で表される構造を有する。

一般式 1:



- 5 一般式 1 において、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ の全てが水素原子であることはなく、また、 $R_4$ 及び $R_{10}$ のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である $R_4$ 又は $R_{10}$ はD-グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ば
- 10 れる基である。なお、本発明でいうグリコシル基とは、糖質の分子構造からアノマー水酸基が除かれた構造として表される原子団を意味する。本発明でいう糖質とは、ポリアルコールのアルデヒド、ケトン、酸、さらには、ポリアルコール自身のほか、アミノ糖などこれらの誘導体、ならびに、オリゴ糖や多糖などこれらの縮合体を含めた化合物群を総称する用語である。また、本発明でいう、置換基を有することのあるグリコ
- 15 シル基における置換基とは、糖質分子における非アノマー水酸基の 1 個以上、又は、糖質分子がアミノ糖の場合はその非アノマー水酸基及びアミノ基の 1 個以上における水素原子を置換しうる基を意味し、具体的に

は、例えば、アルキル基、アシル基、アセチル基、リン酸基、硫酸基などが挙げられる。

本発明の分岐環状四糖がその分岐部分に有するグリコシル基（一般式 1 における  $R_1$  乃至  $R_{12}$  から選ばれる 1 個又は 2 個以上の位置にあるグリ  
5 コシル基）の例としては、具体的には、置換基を有することのある  $\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow4)\text{-}\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル}$   
基（ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上  
が当該基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立してい  
るものとする。）置換基を有することのある  $\alpha\text{-D-グルコピラノシ}$   
10  $\text{ル-}(1\rightarrow6)\text{-}\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-D-}$   
 $\text{グルコピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル}$  基（た  
だし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該  
基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているもの  
とする。）置換基を有することのある  $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシル}$   
15  $\text{-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n \beta\text{-D-ガラクトピラノシル}$  基（ただし、 $n$  は 0 以  
上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場合、  
それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。）置  
換基を有することのある  $\alpha\text{-D-ガラクトピラノシル}$  基、及び置換基を  
有することのある  $\beta\text{-D-キトサミニル}$  基を挙げることができる。本発  
20 明の分岐環状四糖は、以上のグリコシル基から選ばれる 1 種又は 2 種以  
上をその分子内に有し得る。

当該分岐環状四糖のより具体的な第一の例としては、一般式 1 におけ  
る  $R_1$  及び／又は  $R_7$  が、置換基を有することのある  $\{\alpha\text{-D-グルコピ}$   
 $\text{ラノシル-}(1\rightarrow4)\text{-}\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル}$  基（ただし、 $n$   
25 は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  及び  $R_7$  の両方が当該基である場合、それ  
ぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。）である当

該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 3 - 4 及び実験 4 - 3 に示す化学式 1 及び化学式 2 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第二の例としては、一般式 1 における  $R_2$  及び／又は  $R_8$  が、置換基を有することのある  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)-{ $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)-}<sub>n</sub> $\alpha$ -D-グルコピラノシル基(ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 $R_2$  及び  $R_8$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)  
5  
10  
である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 3 - 4 に示す化学式 3 及び化学式 4 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第三の詳細な例としては、一般式 1 における  $R_2$  及び／又は  $R_8$  が、置換基を有することのある { $\beta$ -D-ガラクトピラノシルー(1→6)-}<sub>n</sub> $\beta$ -D-ガラクトピラノシル基(ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 $R_2$  及び  $R_8$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)  
15  
である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 4 - 4 に示す化学式 6 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第四の例としては、一般式 1 における  $R_4$  及び／又は  $R_{10}$  が置換基を有することのある { $\beta$ -D-ガラクトピラノシルー(1→6)-}<sub>n</sub> $\beta$ -D-ガラクトピラノシル基(ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 $R_4$  及び  $R_{10}$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)  
20  
25  
当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 4 - 5 に示す化学式 7 及び化学式 8 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第五の例としては、一般式 1 における  $R_4$  及び／又は  $R_{10}$  が、置換基を有することのある  $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル基である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 4-6 に示す化学式 9 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第六の例としては、一般式 1 における  $R_2$  及び／又は  $R_8$  が、置換基を有することのある  $\beta$ -D-キトサミニル基（「キトサミニル基」は一般に「グルコサミニル基」とも呼ばれる。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造としては、具体的には、後記実験 4-7 に示す化学式 10 を例示することができる。

なお、以上の例は、本発明の分岐環状四糖を、その分岐部分の構成糖及び結合様式によって分類して個々に示したものであるけれども、当該分岐環状四糖はこのように分類される分岐部分をそれぞれ単独で有するのみならず、その 2 種以上を適宜組み合わせる場合もある。例えば、上記の第一の例に示される分岐部分の構造と、上記の第二乃至第六の例のいずれかに示される分岐部分の構造とを組み合わせる分岐環状四糖はその一例であり、その構造式としては、具体的には、後記実験 3-4 に示す化学式 5 を例示することができる。

以上のような本発明の分岐環状四糖は、以上説明したような構造を有する限り、特定の製造方法によるものに限定されず、例えば、有機合成法によって得られるものであっても、また、酵素反応によって得られるものであってもよい。しかしながら、下記に詳述する、本発明が開示する分岐環状四糖の製造方法によれば当該分岐環状四糖を効率的に製造することができるので、当該分岐環状四糖の諸種の分野での利用においては、本発明の製造方法によるものが有利である。本発明の分岐環状四糖



は、例えば、糖質成分として実質的に当該分岐環状四糖のみが含まれる状態、通常、純度 90 % 以上、望ましくは純度 95 % 以上、より望ましくは、純度 97 % 以上に精製された状態で、溶液、非晶質粉末、含蜜結晶などの状態で、また、単離された結晶の状態で提供される。当該分岐

5 環状四糖の結晶は、水や、低級アルコール、ジメチルホルムアミドなどの有機溶媒もしくは、これらの溶媒から適宜選ばれる 2 以上を混合した溶媒から晶出させ、常法にしたがって分蜜することにより単離することができる。水から晶出される当該分岐環状四糖の結晶は、無水結晶又は含水結晶として得られ、斯かる含水結晶の具体例としては、化学式 1、

10 化学式 2、化学式 3、化学式 6 ならびに化学式 7 で表される当該分岐環状四糖の結晶を挙げることができる。これらの含水結晶は、常圧下で加熱したり、常温下で減圧環境下におくことなどの操作により無水結晶に変換することができる。当該分岐環状四糖の結晶の特定は、通常の粉末 X 線回折法によることができる。例えば、化学式 1、化学式 2、化学式

15 3、化学式 6 ならびに化学式 7 で表される分岐環状四糖の含水結晶は、この方法によるとき、主たる回折角 ( $2\theta$ ) として、通常、それぞれ、(1) 8.1°, 12.2°, 14.2° 及び 15.4°, (2) 5.6°, 8.8°, 16.9° 及び 21.9°, (3) 7.9°, 12.1°, 17.9° 及び 20.2°, (4) 11.0°, 12.3°, 1

20 2.8° 及び 24.9°, 及び (5) 8.7°, 13.0°, 21.7° 及び 26.1° を示す。また、当該分岐環状四糖は、これを主成分のひとつとして含む糖組成物としても提供される。当該分岐環状四糖を含む糖組成物は、当該分岐環状四糖を、そのいずれか 1 種のみ又は 2 種以上の合計として、全糖質成分あたり固形物重量換算で、通常、50 % 以上、好適な場合には、60 % 以上、より好適な場合には、70 % 以上、

25 さらに好適な場合には、80 % 以上含有し、溶液、シラップ、ブロック

、顆粒、含水結晶及び／又は無水結晶を含有する結晶質粉末、非晶質粉末、含蜜結晶などの適宜の状態を提供される。

## 2. 分岐環状四糖の製造方法

5 本発明が提供する分岐環状四糖の製造方法は、環状四糖に単糖、オリゴ糖又は多糖からグリコシル基を転移する作用を有する酵素の作用を利用するものであり、環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて当該分岐環状四糖を生成させる工程と、生成した分岐環状四糖を採取する工程とを含むことを特徴とする。

### 2.1. 環状四糖の調製

本発明による製造方法で用いる環状四糖の調製方法は問わず、例えば、（１）グレゴリー・エル・コテら、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第２２６巻、６４１乃至６４８頁（１９９  
15 ４年）に記載された、多糖アルテルナンに加水分解酵素アルテルナナーゼを作用させて環状四糖を生成させる方法や、（２） $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質に $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる方法、（３）還元末端の結合様式として $\alpha$ -１，４グルコシル結合を有するグルコース重合度が２以上の糖質、例えば、澱粉部分分解  
20 物などに $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせ作用させて環状四糖を生成させる方法などによることができる。なお、本発明でいう $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とは、それぞれ、下記（Ａ）及び下記（Ｂ）の酵素活性を有する酵素を意味するものであり、ここに  
25 示される以外の酵素活性の有無や、理化学的性質、起源は問わない。

(A) 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が  $n$  ( $n$  は 2 以上の整数を表す。) の糖質に作用して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式として  $\alpha-1$ , 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が  $n+1$  の糖質を生成する。

(B) 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1$ , 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質に作用して、サイクロ { $\rightarrow 6$  ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) で表される環状四糖を生成する。

因みに、上記 (3) の方法による環状四糖の生成メカニズムは、概略としては以下のとおり推測される。

I)  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が、グリコーゲンや澱粉部分分解物などの  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース基の 6 位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に  $\alpha$  - イソマルトシル基を有する  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖を生成する。

II)  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素が、非還元末端にイソマルトシル基を有する  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース基の 3 位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル - 1, 3 - イソマルトシル基を有する  $\alpha-1$ , 4 グルカン鎖を生成する。

III) 続いて、 $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素が、その非還元末端

にイソマルトシルー 1, 3-イソマルトシル基を有する  $\alpha$ -1, 4 グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシルー 1, 3-イソマルトシル基を  $\alpha$ -1, 4 グルカン鎖から切り離し、環状化して環状四糖を生成する。

- 5      I V)    切り離された  $\alpha$ -1, 4 グルカン鎖が、再度、I) から I I) の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。

環状四糖の工業的製造を目的とする場合、かかるコスト及び労力の点で、上記 (2) 及び (3) の方法が比較的優れており、特に (3) の方法が望ましい。以下、上記 (3) の方法による環状四糖の製造方法を中心に説明する。

#### 2.1.1. $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

- $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成
- 15    酵素は、例えば、両酵素の一方又は両方を産生する微生物を培養し、その培養物に酵素の調製のための通常の方法を適用することにより得ることができる。同じ特許出願人により、平成 12 年 4 月 25 日付で、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託された微生物バチルス・
- 20    グロビスポルス C 9 (受託番号 F E R M   B P - 7 1 4 3)、及び、同じく平成 12 年 4 月 25 日付で、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託された微生物バチルス・グロビスポルス C 1 1 (受託番号 F E R M   B P - 7 1 4 4) は、共に、両酵素の産生能を有するので両
- 25    酵素の給源としてとりわけ有用である (以下、両微生物をそれぞれ「微

生物 C 9」及び「微生物 C 1 1」という場合がある）。

微生物 C 9 (FERM BP-7143) 又は微生物 C 1 1 (FERM BP-7144) を用いる場合の培地ならびに培養条件は、培地については、炭素源としては、例えば、植物由来の澱粉やフィトグリコーゲン、動物や微生物由来のグリコーゲンやプルラン、これらの部分分解物や、D-グルコース、D-フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、L-ソルビトール、糖蜜などの糖質、クエン酸、コハク酸などの有機酸が適宜利用できる。培地中の炭素源の濃度は、用いる炭素源の種類に応じて適宜選択される。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物や、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素化合物が適宜利用できる。無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などの塩類が適宜利用できる。さらに必要に応じてアミノ酸類やビタミン類なども適宜利用できる。

培養条件については、温度は、通常、4℃乃至40℃、好ましくは、20℃乃至37℃、pHは、通常、pH4乃至10、好ましくは、pH5乃至9で、通常、好氣的条件下で、10時間乃至150時間に亙り行うのが好適である。培養に際して溶存酸素濃度を制御することもでき、例えば、0.5乃至20ppmの範囲となるように、通気量や攪拌速度を調節したり、通気に用いる気体の酸素濃度を加減したり、フエーメンター内の圧力を加減することも有利に実施できる。また、微生物が生育でき、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生しうる条件を保持できる限り、回分培養、連続培養、半連続培養などいずれの培養方式を採用してもよい。

上記のような培養の結果得られる微生物 C 9 (FERM BP-71

43) 及び微生物 C 1 1 (FERM B P-7 1 4 4) の培養物は、通常、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を含んでいる。したがって、環状四糖の製造においては、目的に応じて、この培養物をそのままの状態で酵素剤として利用することも、

- 5 また、両酵素を共に含むように、あるいは、両酵素をそれぞれ分離するように培養物から精製して酵素剤として利用することもできる。例えば、培養物から通常の固液分離によって菌体を除去して培養上清を採取し、この培養上清を、必要に応じて、蛋白質の濃縮のための慣用の方法、例えば、硫酸塩析、アセトン又はアルコール沈澱、減圧濃縮、膜濃縮など
- 10 以上にさらに供すれば、両酵素を共に含む部分精製された酵素剤を得ることができる。このように部分精製された酵素剤に、さらに必要に応じて、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーなどの酵素精製のための慣用の方法を適宜組み合わせて適用し、分離される画分から
- 15 、所期の酵素活性を示す画分をそれぞれ別個に採取すれば、所望のレベルにまで精製されたそれぞれの酵素剤を得ることができる。

- $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は以下のようにして測定することができる。パノースを濃度 2 % (w/v) となるように 1 0 0 mM 酢酸緩衝液 (pH 6. 0) に溶解させた基質液 0. 5 ml に酵素液 0. 5 ml
- 20 を加えて、3 5 °C で 3 0 分間保持し、パノースからの環状四糖の生成反応を進行させる。この際、パノースから環状四糖とともにグルコースが生成する。該反応の後、反応液を 1 0 分間煮沸して反応を停止する。反応停止後の反応液をグルコースオキシダーゼ法に供し、反応液中に生成したグルコース量を定量する。本発明において、 $\alpha$ -イソマルトシル転
- 25 移酵素の活性 1 単位は、この条件下で 1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースを生成する酵素量と定義する。

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は以下のようにして測定  
することができる。マルトトリオースを濃度 2 % (w/v) となるよう  
に 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させた基質液 0.5 ml  
に酵素液 0.5 ml を加えて、35℃で60分間保持し、マルトトリオ  
5 ースからのイソマルトシルマルトースの生成反応を進行させる。この際  
マルトトリオースから、イソマルトシルマルトースとともにマルトース  
も生成する。該反応の後、反応液を10分間煮沸して反応を停止する。  
反応停止後の反応液をマルトースを検出する通常のHPLCに供し、反  
応液中に生成したマルトース量を定量する。本発明において、 $\alpha$ -イソ  
10 マルトシルグルコ糖質生成酵素活性の1単位は、この条件下で1分間に  
1  $\mu$ mol のマルトースを生成する酵素量と定義する。

因みに、微生物 C9 (FERM BP-7143) 及び微生物 C11  
(FERM BP-7144) から得られる両酵素の、上記で定義され  
る両酵素活性を指標として確認される理化学的性質は、下記表 1 にまと  
15 めたとおりである。

表 1 :

	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素	$\alpha$ -イソマルトグルコ糖質生成酵素
分子量 (分析法)	約82,000乃至132,000ダルトン (SDS-ゲル電気泳動法)	約117,000乃至160,000ダルトン (SDS-ゲル電気泳動法)
等電点 (分析法)	pI約5.0乃至6.0 (アンフォライン含有電気泳動法)	pI約4.7乃至5.7 (アンフォライン含有電気泳動法)
至適温度 (分析条件)	約45°C乃至50°C (pH6.0で30分間反応)	約40°C乃至45°C (pH6.0で60分間反応) 約45°C乃至50°C (1mM $\text{Ca}^{2+}$ 存在下で同条件)
至適pH (分析条件)	pH約5.5乃至6.0 (35°Cで30分間反応)	pH約6.0乃至6.5 (35°Cで60分間反応)
温度安定性 (分析条件)	約40°Cまで (pH6.0で60分間保持)	約35°C乃至40°Cまで (pH6.0で60分間保持) 約40°C乃至45°Cまで (1mM $\text{Ca}^{2+}$ 存在下で同条件)
pH安定性 (分析条件)	pH約4.0乃至9.0 (4°Cで24時間保持)	pH約4.5乃至10.0 (4°Cで24時間保持)

なお、酵素剤が $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を共に含む組成物の場合、該酵素剤は澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性を有する。澱粉部分分解物からの環状四糖

5 生成活性（以下、単に「環状四糖生成活性」という場合、本活性を意味するものとする。）は以下のとおり測定することができる。澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#100』、松谷化学株式会社製造）を濃度2%（w/v）となるように50mM酢酸緩衝液（pH6.0）に



溶解させた基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml を加えて、35℃で60分間保持し、環状四糖生成反応を進行させる。この反応の後、反応液を10分間煮沸して反応を停止する。反応停止後の反応液に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬製造）を70単位/mlで、及びグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）を27単位/mlで含む50mM酢酸緩衝液（pH 5.0）1mlを加え、50℃で60分間処理した後、10分間煮沸して $\alpha$ -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼ処理を停止する。この後、反応液を、環状四糖を検出する通常のHPLCに供し、反応液中に生成した環状四糖を定量する。本発明において、澱粉部分分解物からの環状四糖生成活性の1単位は、この条件下で1分間に1  $\mu$ molの環状四糖を生成する酵素量と定義する。

以上に示したような微生物からの調製方法以外に、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、例えば、組換えDNA技術によっても得ることができる。同じ特許出願人は、特願2000-350142号及び特願2001-5441号の明細書に、それぞれ、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をコードする微生物C11（FERM BP-7144）のDNAの塩基配列を開示している。これらの開示された塩基配列は、それぞれの出願明細書に記載のとおり、N末端にシグナルペプチドを有するそれぞれの酵素の前駆体に対応するコード領域の塩基配列とともに、5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域の塩基配列を含んでいる。本明細書の配列表においては、特願2000-350142号明細書に開示された微生物C11の塩基配列から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の前駆体に対するコード領域の塩基配列を抄出して配列番号1に、また、特願2001-5441号明細書に開示された微生物C11の塩基配列から

、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の前駆体に対するコード領域の塩基配列を抄出して配列番号2にそれぞれ示している。これらの塩基配列を参照し、斯界において慣用の組換えDNA技術、例えば、DNAのクローニング法、部位特異的変異導入法、微生物などの細胞の形質転換法、DNAの人為的発現法などを適用すれば、両酵素は得ることができる。慣用の組換えDNA技術は、例えば、ジェイ・サンプルックら、『モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、第3版』（2001年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行）に種々詳述されている。

10

#### 2.1.2. $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いる環状四糖の調製

$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて澱粉部分分解物などの基質から環状四糖を製造するには、  
15 基質、通常は、基質の水溶液に、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を一旦作用させた後、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させるか、該基質に両酵素を同時に作用させればよく、環状四糖の生成効率の点では両酵素を同時に作用させるのが比較的望ましい。この方法で利用できる基質は、非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質であればよく、例えば、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉及びグリコーゲンなどが例示できる。製造コストを考慮すると、始発原料として、例えば、とうもろこし、小麦、米などに由来する地上澱粉や、馬鈴薯、サツマイモ、  
20 タピオカなどの地下澱粉を用い、斯かる澱粉の懸濁液に液化型 $\alpha$ -アミ

25

ラーゼを作用させるか、又は、澱粉懸濁液を酸性条件下で加熱して得られる液化澱粉に両酵素を作用させるのが好適である。環状四糖をより効率的に生成させるためには、液化澱粉のDE（デキストロース・エクイバレント）は低いほどよく、通常、DE 20以下、望ましくはDE 12

5 以下、さらに望ましくはDE 5以下が好適である。液化澱粉への $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の作用に先立ち、又は該作用と並行して、澱粉枝切り酵素、例えば、プルラナーゼやイソアミラーゼを作用させると、環状四糖の生成効率が向上する場合があるので、これらの酵素を利用することも有利に実施できる。

- 10 基質濃度は、環状四糖を生成するものである限り特に制限はない。1回の操作あたりの環状四糖の収量を高める上では基質濃度は高いほど好適であり、固形物濃度として、通常、0.1%（w/w）以上、望ましくは、1%（w/w）以上が好適である。基質は、水への溶解度を大きく超える濃度で含有する溶液の状態で用いることもできるけれども、上
- 15 記液化澱粉の場合、通常、固形分濃度40%（w/w）以下、望ましくは、35%（w/w）以下が、操作のし易さなどの点で好適である。

- 反応条件は、環状四糖を生成するものである限り特に制限はない。例えば、温度は、通常、常温から50℃まで、望ましくは、30℃乃至45℃が好適であり、pHは、通常、pH 4.5乃至8、望ましくは、pH 5.5乃至7が好適である。反応液中に、用いる酵素のいずれかを安定化する金属イオン、例えば、 $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ を共存させることも有利に実施できる。反応時間は、用いる酵素量に応じて、反応の進行状況を勘案して適宜選択することができる。
- 20

- 基質に $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させる際に、必要に応じて、他の糖転移酵素を併用することも有利に実施できる。例えば、シクロマルトデキストリングルカ
- 25

ノトランスフェラーゼを併用すると、環状四糖の生成効率が、併用しない場合に比べて向上する場合がある。

また、基質に $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させる際に用いる酵素剤として、両酵素を産生  
5 する微生物を利用することもできる。微生物を酵素剤として利用するには、例えば、両酵素の産生能を有する、微生物C9（FERM BP-7143）及びC11（FERM BP-7144）などの微生物を、それが生育する条件下で所期の菌体数になるまで培養する。両微生物の培養のための条件は、酵素の製造のための上述の培養条件が有利に利用  
10 できる。そして培養の結果得られる培養物を、上記で述べた酵素剤の場合と同様に基質に作用させればよい。

以上のようにして酵素を作用させた反応液には環状四糖が生成している。この反応液をそのまま、環状四糖溶液として利用できる一方、反応液から環状四糖を精製して利用することもできる。環状四糖の精製には  
15 、公知の糖質の精製方法を適宜採用することができ、例えば、活性炭による脱色、H型及びOH型イオン交換樹脂による脱塩、イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどを用いるカラムクロマトグラフィーによる分画（通常、クロマト分離とも呼ばれる。）、アルコールやアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈澱、適度な分離性能を有する膜による分離、  
20 さらに、混在もしくは残存している他の糖質の分解・除去処理、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどのアミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼなどの酵素処理、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などを必要に応じて適宜組み合わせ、環状四糖の精製度を高めることも有利に実施できる。以上のようにして精製された環状四  
25 糖もしくはこれを含む糖組成物は、濃縮、結晶化、乾燥、粉碎、溶解などの処理を適宜組み合わせ、適用することにより、溶液、シラップ、ブ

ロック、粉末、顆粒、結晶など所望の性状とすることができる。

以上、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を組み合わせる利用する環状四糖の製造方法を概説した。一方、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を単独で用いる方法（上記で述べた環状  
5 四糖の製造方法（2））においては、同様に当該酵素を製造した後、これを、上記の酵素反応条件に準じて、市販の又は常法により調製したパノースなどの $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質に作用させ、必要に応じて、生成する環状四糖を上記と同様に精製すればよい。

## 10 2.2. 環状四糖にグリコシル基を転移する酵素

本発明による製造方法で用いる酵素は、環状四糖に対して、単糖、オリゴ糖又は多糖（以下、当該製造方法で用いられる該単糖、オリゴ糖及び多糖を総称して「グリコシル基供与体」という。）からグリコシル基を転移して、上記で述べた一般式1で表される分岐環状四糖を生成する  
15 作用を有するものである限り、他の作用の有無や、起源は問わない。具体的には、例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ及びリゾチームが挙げられる。以下、環状四糖へのグリコシル基の転移（以下、「グリ  
20 コシル基の転移」を単に「グリコシル転移」という場合がある。）の観点から、それぞれの酵素の特性について概略を示す。

シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.19.）は、結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を含むグルコース重合度2以上の糖質、例えば、マルトオリゴ糖、マルトデキ  
25 ストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性

澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、グリコーゲンなどを、通常、グリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第一の例に示される分岐環状四糖を生成する。

5         $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、通常、パノースなどの  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質をグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第二の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式 3 又は化学式 4 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

10         $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、結合様式として  $\alpha-1$ , 4 グリコシル結合を含むグルコース重合度 3 以上の糖質、例えば、重合度 3 以上のマルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、グリコーゲンなどを、通常、グリコシル基供与体とし、化学式 1 で示される分岐環状四糖を通常は生成する。

15         $\beta$ -ガラクトシダーゼ (E C 3. 2. 1. 23.) は、通常、ラクトースをグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第三及び第四の例に示される分岐環状四糖を生成する。なお、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは、起源によって、生成する分岐環状四糖の種類や組成が異なる場合がある。例えば、バチルス・サーキュランス起源の該酵素は、化学式 6 に示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する一方、アスペルギルス・ニガー起源の同酵素は化学式 6 乃至 8 に示されるもののいずれをも生成する。

25         $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (E C 3. 2. 1. 22.) は、通常、メリビオースをグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状

四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第五の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式 9 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

5        リゾチーム（EC 3. 2. 1. 17.）は、N-アセチルキトサミン（別名N-アセチルグルコサミン）を構成糖とし、結合様式として $\beta$ -1, 4グリコシル結合を含むオリゴ糖又は多糖、例えば、N-アセチルキトオリゴ糖やキチンなどを通常はグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第六の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式 10 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

      なお、上記では、個々の酵素を環状四糖に単独で作用させた際にそれぞれが主として触媒する転移反応を述べたけれども、以上のような酵素を2種以上組み合わせて利用することにより、さらに別の分岐環状四糖を生成させることもできる。例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼと $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを組み合わせ用いて、両酵素による反応においてグリコシル基供与体となる適宜の糖質と環状四糖との共存下に両酵素を作用させれば、化学式 5 で示される分岐環状四糖が生成する場合がある。さらに別の酵素の組み合わせにより多種多様な分岐環状四糖の生成が可能である。また、例えば、同じ特許  
20    出願人による特開平10-304882号公報に開示されたコージビオースホスホリラーゼや、グリコーゲンホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 1.）、マルトースホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 8.）、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（EC 3. 2. 1. 20.）、オリゴ-1, 6-グルコシダーゼ（EC 3. 2. 1. 10.）、 $\beta$ -グルコシダーゼ（  
25    EC 3. 2. 1. 21.）などの上記で例示した以外の糖質関連酵素であっても、環状四糖に対してグリコシル基供与体からグリコシル基を

転移して、上記で述べた一般式 1 で表される分岐環状四糖を生成する作用を有するものである限り、本発明による製造方法に有利に利用できる。とりわけ、上記のコージビオースホスホリラーゼは、反応条件によっては、単糖の 1 種であるグルコース 1-リン酸をグリコシル基供与体として環状四糖にグリコシル基を転移して、一般式 1 における  $R_3$ 、 $R_6$ 、 $R_9$  及び  $R_{12}$  から選ばれる 1 個又は 2 個以上がグリコシル基やコージビオシル基などの  $\alpha-1, 2$  グリコシル結合を有するオリゴグリコシル基である分岐環状四糖を生成し得るので、目的に応じて有利に利用できる。

以上例示した酵素はいずれも公知の酵素であって、本発明の実施においては、目的に応じて市販の酵素剤を利用するか、あるいは、各酵素の調製についての報告例にしたがって調製すればよい。

### 2.3. 環状四糖からの分岐環状四糖の製造

本発明による製造方法を実施するには、まず、目的とする分岐環状四糖の構造に応じて用いる酵素（以下、本項 2.3. においては、「グリコシル転移酵素」という。）を選択し、これを、市販の酵素剤を購入したり常法により調製するなどして入手する。また、用いる酵素の特性にしたがって、グリコシル基供与体としての糖質を市販の調製品を購入したり常法により調製するなどして入手する。環状四糖は、上記 2.1. の項に示したいずれかの方法にしたがって調製する。

上記のように入手される基質（環状四糖とグリコシル基供与体）とグリコシル転移酵素を用いて、基質の混合物、通常は、両者を共に含む水溶液に、グリコシル転移酵素を添加して反応させれば、反応混合物中に目的とする分岐環状四糖を生成させることができる。グリコシル転移酵素の作用条件は、所期の分岐環状四糖生成が起こる限り制限はない。水



系で反応を行う場合、基質の濃度は、反応温度におけるそれぞれの水への溶解度にもよるけれども、環状四糖については、通常、1% (w/w) 乃至40% (w/w)、望ましくは、5% (w/w) 乃至35% (w/w) とし、グリコシル供与体については、これが溶解する範囲で可能な限り高濃度とするのが好適であり、例えば、環状四糖の濃度に対して、可能であれば、1/2 倍の濃度以上、望ましくは、等濃度以上、さらに望ましくは、2 倍の濃度以上とするのが好適である。反応温度及び pH は、反応中にグリコシル転移酵素が完全に失活する程度のものでなければよく、用いる酵素の酵素学的性質を勘案して適宜選択される。酵素量は、基質濃度と実施する反応時間に応じて、反応終了時点で所期の生成物が得られるよう、適宜選択される。

斯くして得られる分岐環状四糖を含む反応混合物は、そのまま、当該分岐環状四糖を含む糖組成物として利用することもできるけれども、通常は、反応混合物から糖質を精製して利用される。糖質の精製は、一般的な方法にしたがえばよく、例えば、活性炭による脱色、H 型及び OH 型イオン交換樹脂による脱塩などが適宜採用でき、さらに必要に応じて、イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどを用いるカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールやアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈澱、適度な分離性能を有する膜による分離、さらには、混在もしくは残存している他の糖質の分解・除去処理、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどのアミラーゼや、 $\alpha$ -グルコシダーゼなどの酵素による処理、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などを適宜組み合わせて、目的とする分岐環状四糖の精製度を高めることも有利に実施できる。以上のようにして精製された分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、濃縮、結晶化、乾燥、粉碎、溶解などの処理を適宜組み合わせて適用したり、さらに、必要に応じて、本発明の分

岐環状四糖以外の適宜の糖質と混合して、溶液、シラップ、ブロック、含水結晶及び／又は無水結晶を含有する結晶質粉末、非晶質粉末、顆粒、単離された結晶、含蜜結晶など所望の状態とすることができる。

5      なお、因みに、上記2.1.2.の項に示した、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の作用による環状四糖の生成反応や、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質への作用による環状四糖の生成反応においては、反応条件によりその生成量の増減はあるものの、通常、本発明の分岐環状四糖が副生成される。ここで副生成する分岐環状四糖のうち量的に主要なものは、化学式  
10      1で示されるもののほか、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第二の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式3及び化学式4で示されるもののや、化学式5で示されるものである。したがって、目的に応じて、上記の両酵素による反応産物や $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素による反応産物から、分岐環状四糖を環状四糖と分離するように採取することにより、  
15      本発明の分岐環状四糖を得ることもできる。

### 3. 分岐環状四糖の用途

本発明の分岐環状四糖は、その基本構造が環状四糖と共通であることから、通常、環状四糖と同等の特性・機能を有する。したがって、当該  
20      分岐環状四糖は、基本的に、環状四糖と同様の目的で利用することができる。以下、同じ特許出願人による特願2000-234937号（国際公開番号第WO 02/10361 A1号）の明細書に開示された環状四糖の用途に準じて利用することができる本発明の分岐環状四糖の利用例を概説する。

25      本発明の分岐環状四糖は、その分岐構造を構成するグリコシル基の種

類や数によって異なるものの、通常、低甘味もしくは無甘味で上品な味質を示す非還元性の白色粉末で、安定な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変すること、異臭を発生することなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。したがって、本発明の分岐環状四糖は、  
5 飲食物、化粧品、医薬品をはじめとする諸種の分野で、素材、基剤などとして配合して利用することができる。

本発明の分岐環状四糖は、包接能を有していることから、香気成分、有効成分などの揮散、品質劣化を防止し、香気成分、有効成分の安定化保持に極めて優れている。この際、必要ならば、シクロ（環状）デキストリン類、分岐シクロデキストリン類、シクロデキストラン類、シクロフラクタン類など他の環状糖質を併用することで、包接能による安定化を強化することも有利に実施できる。シクロデキストリン類などの環状糖質としては、高純度のものに限る必要はなく、低純度の環状糖質、  
10 例えば、多量のマルトデキストリンとともに各種のシクロデキストリンを含有した澱粉部分分解物なども有利に利用できる。

環状四糖は、アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼによって分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、また、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。また、環状四糖は、虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用でき、さらに、口腔内の固形物の付着、固結を防止する機能をも併せもっている。一方、本発明の分岐環状四糖は、その基本構造が環状四糖と共通であることから、  
20 カロリーのある、又は虫歯誘発菌によって発酵されやすい通常の糖質と比べると、低カロリー糖質や低う蝕性糖質としての有用性が高い。しかも、本発明の分岐環状四糖自体は、無毒、無害の糖質であり、危険性が

なく、安定な素材・基剤などとして有用であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤又は糖衣錠として利用することも有利に実施できる。また、本発明の分岐環状四糖は、浸透圧調節性、賦形性、  
5 照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の結晶防止性、難醗酵性などの性質を具備している。したがって、本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、糖質調味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

- 10 本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、そのまま、上品な味質を不要するための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、異性化糖、砂糖、麦芽糖、トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチ  
15 ルリチン、ソーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用することも、又、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や $\alpha$ -グリ  
20 コシルステビオシド、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。

- 本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、そのまま、  
25 または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用するこ

とも随意である。

本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物が呈する上品な味質は、甘味、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の

5 甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブル

10 シュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料への甘味料、更には、呈味改良剤、品質改良剤などとして使用することも有利に実施できる。また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン

15 、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類

20 、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬け、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウに、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん

25 干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ

巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、品質改良などに有利に実施できる。また、家畜、家禽、その他は蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などの嗜好性向上や物性改善などをの目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種の固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への嗜好性向上剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらに品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロナー $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、 $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン I I などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCG ワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビ

タミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸  
またはそのエステル誘導体、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、  
プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラク  
ターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラ  
5 エキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類またはローヤ  
ルゼリーなどの各種生理活性物質、更には、ウイルス、乳酸菌、酵母な  
どの生菌ペーストなどの有効成分や活性を失うことなく、安定で高品質  
の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などを容易に製造で  
きることとなる。

- 10 以上述べたような各種組成物に、本発明の分岐環状四糖もしくはこれ  
を含む糖組成物を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの  
工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、  
浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適  
宜選ばれる。その割合は、全重量に対する当該分岐環状四糖もしくはこ  
15 れを含む糖組成物の固形物重量の占める百分率として、通常、0.1%  
以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

- 以上に示した、環状四糖と同様の用途以外に、本発明の分岐環状四糖  
は、ビフィズス活性を示す場合があるので、ビフィズス因子として、飲  
食物、健康食品、健康補助食品、医薬品などに配合して利用することも  
20 できる。この際に、ビフィズス活性を示す他の糖質、例えば、乳化オリ  
ゴ糖、N-アセチル-D-キトサミン（N-アセチルD-グルコサミン  
）、ラクツロースなどを併用することも有利に実施できる。また、本発  
明の分岐環状四糖は、環状四糖の水溶液中での晶出を抑制する機能があ  
ることから、環状四糖の晶出抑制剤として利用することもできる。例え  
25 ば、上記のいずれかの方法で得られた環状四糖の水溶液、又は、環状四  
糖とともに、グルコース、マルトース、パノースなどの還元性糖質を含

有する水溶液に、本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物を添加すると、得られる溶液を濃縮することにより、環状四糖を、その本来の溶解度を超える濃度で含む環状四糖高含有溶液を得ることができる。また、必要に応じて、斯かる溶液は、更に水素添加処理して、溶液中

5 に含まれる還元性糖質を糖アルコールに変換して用いることもできる。斯くして得られる環状四糖高含有溶液は、本発明の分岐環状四糖を含まない環状四糖溶液に比べて、タンク貯蔵、ポンプ輸送、タンクローリー輸送をより効率的に行うことが可能となる。したがって、本発明の分岐環状四糖は、環状四糖の工業的な取扱において極めて有用である。

10 以下、実験及び実施例に基づいて本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実験 1：微生物の培養物からの環状四糖の単離と同定

パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）5%（w/v）、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5%（w/v）、リン酸二カリウム0.1%（w/v）、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06%（w/v）、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%（w/v）及び水からなる液体培地を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌した後、冷却した。この培地に、バチルス グロビスポルス C9（FERM

15 BP-7143）を接種し、27℃、230rpmの条件で48時間回転振盪培養した。培養液を遠心分離して菌体を除去し、培養上清を得た。得られた培養上清を、120℃で15分間オートクレーブし、放冷した後、不溶物を遠心分離して除去し、上清を回収した。この上清中には、硫酸-メタノール法で陽性で、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法

20 で陰性の非還元性糖質の存在が確認された。

25



上記のオートクレーブ後の上清約 90 ml を pH 5.0、45℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物 1 g 当り 1500 単位とグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物 1 g 当り 75 単位添加して 24 時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムで pH 12 に調整し、2 時間煮沸して、本上清中の還元糖を分解した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、イオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン PK 218』及び『WA 30』、三菱化学工業株式会社製造）を用いて脱色・脱塩し、更に、活性炭で脱色した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン SK-1B』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA 411』、オルガノ株式会社製造）で再度脱塩し、精密濾過した後、エバポレーターで濃縮し、凍結真空乾燥して固形物として約 0.5 g の非還元性糖質の粉末を得た。

上記で粉末として得た非還元性糖質の純度を高速液体クロマトグラフィー法（以下、「HPLC」と略記する。）で調べた。HPLC において、カラムには『Shodex KS-801 カラム』（昭和電工株式会社製造）を用い、溶離液には水（流速 0.5 ml/min）を用い、カラム内温度を 60℃とし、溶出される糖質の検出を示差屈折計（商品名『RI-8012』、東ソー株式会社製造）を用いて行なった。第 1 図に示すように、溶出時間 10.84 分に単一ピークが検出された。このピーク面積から、本糖質の純度は 99.9% 以上と求められた。

上記の方法で得た非還元性糖質を、高速原子衝撃法による質量分析（FAB-MS）に供した。質量数 649 のプロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数は 648 であることが判明した。

上記の方法で得た非還元性糖質を、硫酸を用いて加水分解し、通常の

ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、上記で求めた質量数と非還元性という特性を考慮すると、本糖質はD-グルコース4分子からなる環状糖質であると考えられた。

5 上記の方法で得た非還元性糖質を核磁気共鳴法（以下、「NMR」と略記する）に供した。その結果、第2図に示す $^1\text{H}$ -NMRスペクトルと、第3図に示す $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルが得られた。既知糖質のものとの異同を検討したところ、グレゴリー・エル・コテら、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第226巻、641乃至648頁（1994年）に記載された環状四糖のスペクトルと一致した。

10 以上の結果により、上記の方法で単離した非還元性糖質を環状四糖、すなわち、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ ) と同定した。

実験2： $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

20 実験2-1： $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を含む酵素剤

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0%（w/v）、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.8%（w/v）、リン酸二カリウム0.1%（w/v）、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06%（w/v）、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%（w/v）及び水からなる液

体培地を500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌した後、冷却した。この培地に、バチルス・グロビスポルスC9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230rpmの条件で48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の液体培地を約20L入れ、加熱滅菌後、冷却して温度27℃に調整した後、種培養を1%（v/v）の割合で接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保持しつつ、48時間通気攪拌培養した。この培養液を10,000rpmで30分間遠心分離し、培養上清約18Lを回収した。回収した培養上清の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約1.5単位/ml、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.45単位/ml、環状四糖生成活性は約0.95単位/mlであった。

この培養上清を、限外濾過膜（商品名『API-2013』、旭化成工業株式会社製造）を用いて液量2Lにまで濃縮し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵を含む酵素剤を得た。本酵素剤の環状四糖生成活性は約8.5単位/mlであった。

#### 実験2-2：精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素

実験2-1の方法で得た、バチルス・グロビスポルスC9の培養上清約18L（ $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性26,900単位）を、4℃の条件下、80%飽和硫酸で24時間塩析した。生成した沈殿を、10,000rpmで30分間遠心分離して回収し、10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析し、透析内液を回収した。

上記の硫安塩析後の透析内液を、イオン交換樹脂（商品名『セパビー  
ズ F P - D A 1 3 ゲル』、三菱化学株式会社製造、樹脂量 1 0 0 0 m l  
）を充填したカラムに負荷し、非吸着画分を採取した。

上記のイオン交換樹脂精製画分を、1 M 硫安を含む 1 0 m M リン酸緩  
5 衝液（p H 7 . 0）に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離に  
より不溶物を除去した後、アフィニティーカラムクロマトグラフィーに  
供した。ゲルは、『セファクリル H R S - 2 0 0 ゲル』（アマシャ  
ム・バイオテック株式会社製造、ゲル量 5 0 0 m l）を用い、溶出は、濃  
度 1 M から 0 M まで直線的濃度勾配をもたせた硫安溶液の通液により行  
10 った。硫安濃度 0 M 付近で溶出された、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活  
性を示す画分を採取した。

上記のアフィニティーカラム精製画分を、1 M 硫安を含む 1 0 m M リ  
ン酸緩衝液（p H 7 . 0）に対して透析した。透析内液を回収し、遠心  
分離により不溶物を除去した後、疎水カラムクロマトグラフィーに供し  
15 た。ゲルは、『ブチルトヨパール 6 5 0 M ゲル』（東ソー株式会社製  
造、ゲル量 3 5 0 m l）を用い、溶出は、濃度 1 M から 0 M まで直線的  
濃度勾配をもたせた硫安溶液の通液により行った。硫安濃度 0 . 3 M 付  
近で溶出された、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を示す画分を採取し  
た。

20 上記の疎水カラム精製画分を、1 M 硫安を含む 1 0 m M リン酸緩衝液  
（p H 7 . 0）に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により  
不溶物を除去した後、再度上記と同じ条件でアフィニティーカラムクロ  
マトグラフィーに供し、活性画分を採取した。

上記の 2 度目のアフィニティーカラム精製画分は、アクリルアミド濃  
25 度 7 . 5 %（w / v）の S D S - P A G E において、分子量 1 1 2 , 0  
0 0  $\pm$  2 0 , 0 0 0 ダルトンの位置に単一の蛋白質バンドを示した。ま

た、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性の測定と蛋白質定量により求めた比活性は約 26.9 単位/mg 蛋白質であった。斯くして $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製標品を得た。

## 5 実験 2-3：精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

実験 2-1 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C9 の培養上清約 18 L ( $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性 8,110 単位)を、実験 2-2 の方法にしたがって、80%飽和硫酸による塩析、透析、イオン交換樹脂による精製に供した。

10 上記のイオン交換樹脂精製画分を、1 M硫酸を含む 10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、アフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『セファクリル HR S-200 ゲル』(アマシャム・バイオテック株式会社製造、ゲル量 500 ml) を用い、溶出は、濃度 1 Mから 0 Mまで直線的濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液に続いて  
15 濃度 0 mMから 100 mMまで直線的濃度勾配をもたせたマルトテトラオース溶液の通液により行った。マルトテトラオース濃度 30 mM付近で溶出された、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を示す画分を採取した。

20 上記のアフィニティーカラム精製画分を、1 M硫酸を含む 10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、疎水カラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『ブチルトヨパール 650 Mゲル』(東ソー株式会社製造、ゲル量 350 ml) を用い、溶出は、濃度 1 Mから 0 Mまで直線的  
25 濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液により行った。硫酸濃度 0.3 M付

近で溶出された、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を示す画分を採取した。

上記の疎水カラム精製画分を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により  
5 不溶物を除去した後、再度上記と同じ条件でアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を採取した。

上記の2度目のアフィニティーカラム精製画分は、アクリルアミド濃度7.5%（w/v）のSDS-PAGEにおいて、分子量140,000 $\pm$ 20,000ダルトンの位置に単一の蛋白質バンドを示した。また、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定と蛋白質定量により求めた比活性は約13.6単位/mg蛋白質であった。斯くして $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製標品を得た。

なお、以上の実験2-1乃至実験2-3では、バチルス・グロビスポルスC9からの酵素の調製結果を示したけれども、バチルス・グロビス  
15 ポルスC11（FERM BP-7144）からも、上記の方法に準じて操作することにより両酵素の精製標品を得ることができる。因みに、実験2-1乃至実験2-3に準じて微生物C11から精製した両酵素の性質は以下のとおりであった。

（A）  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素

20 SDS-PAGEにおける分子量：102,000 $\pm$ 20,000ダルトン

比活性：約29.6単位/mg蛋白質

（B）  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

SDS-PAGEにおける分子量：137,000乃至20,000  
25 ダルトン

比活性：13.4単位/mg蛋白質

実験 3：澱粉部分分解物への酵素作用による環状四糖の生成とこれに副生成する分岐環状四糖

#### 実験 3－1：酵素反応

5        3.7 kg の澱粉部分分解物（商品名『パインデックス # 100』、松谷化学工業株式会社製造）を、35 L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、この溶液に、実験 2－1 の方法で得た酵素剤を、環状四糖生成活性として 17500 単位相当加え、30℃で2日間保持して反応させ、その後反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。  
10        この反応液を45℃に調整した後、11 g（137,500 単位）の  $\alpha$ -アミラーゼ剤（商品名『ネオスピターゼ PK2』、ナガセ生化学工業株式会社製造）及び44 g（140,800 単位）のグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製造）を加え、pH 6.0 に調整した後、45℃で1日間保持して反応させ、その後  
15        反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を常法により濾過し、濾液を逆浸透膜を用いて固形物濃度約16%（w/w）にまで濃縮した。この濃縮液を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮に供し、約3.5 kg の固形物を含む糖液を約6.1 kg 得た。

      この糖液を、実験 1 の方法で単離した環状四糖と公知の糖質を標準試  
20        料として用いて、以下の HPLC により分析した。すなわち、クロマトグラフ装置『CCPM』（東ソー株式会社製造）、カラム『AQ-303 ODS』（株式会社ワイエムシー製造、内径 4.6 mm×長さ 25 cm）、溶離液として水（流速 0.5 ml/分）を用い、カラム温度を40℃とし、溶出される糖質を示差屈折計（商品名『RI-8012』  
25        、東ソー株式会社製造）により検出した。この分析により検出された成

分のうちピーク面積が比較的大きいものを、保持時間と、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 2 に示す。

表 2 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
10.5	環状四糖	43.8%
19.7	副生成物 1	10.6%
24.7	副生成物 2	3.3%
49.9	副生成物 3	0.5%
58.2	副生成物 4	0.3%

\*, いずれもおおよその値である。

\*\*, 認められた全てのピークの面積の合計を 100 としたときの相対値。

- 5 因みに、上記 H P L C においては、多くの場合、分子量の大きいものほど保持時間が長くなるという傾向がある。このことから、表 1 にまとめた結果は、本実験による酵素反応が、通常、環状四糖とともに、環状四糖より分子量の大きい、すなわち、構成糖の数がより多い糖質を副生成することを示している。

10

### 実験 3 - 2 : 環状四糖の調製

- 15 実験 3 - 1 の方法で得た糖液 6 . 1 k g を、イオン交換樹脂（商品名『アンバーライト C R - 1 3 1 0 』、N a 型、オルガノ製造、樹脂量約 2 2 5 L）を充填したカラム（内径 1 3 . 5 c m × 長さ 1 6 0 c m のカラムを 1 0 本直列に連結）を用いてクロマト分離に供した。移動相には水（流速 4 5 L / h）を用い、カラム温度は 6 0 ℃とした。カラムから



の溶出液を分画し、各画分の糖組成を以下の実験 3-1 に示した HPLC により求めた。環状四糖を比較的多く含む画分を合一し、1530 g の固形物を含む糖液を得た。上記と同じ条件による HPLC で分析し、ピーク面積に基づいて計算したところ、この合一した画分（環状四糖高含有画分）は、全糖質あたり、環状四糖を 79.8%、イソマルトースを 6.1% の割合で含むものであった。

環状四糖高含有画分の固形物として 1310 g 相当を、pH 5.0、50℃ に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物 1 g 当り 1000 単位とグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物 1 g 当り 60 単位添加して 20 時間処理した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン PK 218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA 411』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を上記のクロマト分離の条件にしたがって分画し、環状四糖の純度が 97% 以上の画分を採取した。採取した画分を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮し、固形物約 1260 g を含む糖液を得た。この糖液を、固形物濃度約 50%（w/w）に調整した後、円筒状のプラスチック容器に入れ、穏やかに回転させながら、温度を 65℃ から 20℃ にまで約 20 時間かけて降下させ、結晶を析出させた。分蜜により析出した結晶を採取し、60℃ で 3 時間常圧乾燥し、544 g の結晶粉末を得た。本品は、純度 99.9% の環状四糖の結晶であり、水分を 12.7% 含むものであった。

## 25 実験 3-3：副生成物の単離

実験 3-1 の方法で得た糖液 6.1 kg を、実験 3-2 に記載したクロマト分離にしたがって分画し、各画分の糖組成を実験 3-1 に記載の HPLC により分析した。副生成物 1 及び副生成物 2 を比較的多く含む画分を合一する（画分 1）一方、副生成物 3 及び副生成物 4 を比較的  
5 多く含む画分を別途合一した（画分 2）。画分 1 は固形物 320 g を含み、画分 2 は固形物 150 g を含んでいた。HPLC によるクロマトグラムのピーク面積より両画分の糖組成を求めた。画分 1 は、全糖質あたり、副生成物 1 を 47.9%、副生成物 2 を 14.9% 含んでいた。画分  
10 2 は、上記 HPLC における保持時間が副生成物 2 より長い成分（副生成物 3 及び 4 を含む）を、全糖質あたり 25% 以上含んでいた。

上記の画分 1 を水酸化ナトリウムで pH 11 以上に保ちつつ、95℃ 以上に 1 時間保持して還元糖を分解した。この後、常法にしたがって、脱色、脱塩、濾過、濃縮した。濃縮液のうち、固形物重量として 50 g 相当を、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして  
15 『YMC-Pack ODS-A R355-15 S-15 120 A』（株式会社ワイエムシー製造）を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、副生成物 1 を純度 97% 以上で含む画分を固形物として 20 g と、副生成物 2 を純度 96% 以上で含む画分を固形物として 5 g 得た。

20 上記の画分 2 を、画分 1 の場合と同様に、還元糖の分解に供した後、脱色、脱塩、濾過、濃縮した。濃縮液のうち、固形物重量として 10 g 相当を、引き続き画分 1 の場合と同様にして、分取用クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、副生成物 3 を純度 97% 以上で含む画分を固形物として 77 mg と、副生成  
25 物 4 を純度 97% 以上で含む画分を固形物として 77 mg 得た。

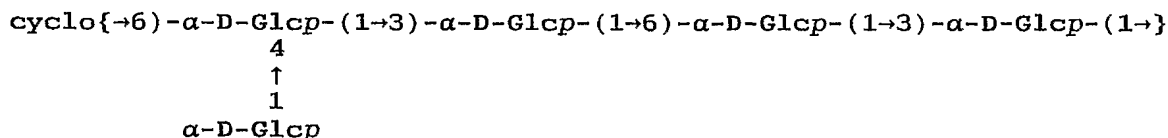
## 実験 3 - 4 : 副生成物の同定

実験 3 - 3 で得た副生成物 1 乃至 4 の高含有画分を次に示す分析の全て又は一部に供した。(1) 質量数の決定は高速原子衝撃法による質量分析により、(2) 還元力の測定はソモジーネルソン法により、(3) 5 構成糖の決定は硫酸による加水分解の後、糖質を分析するための通常のガスクロマトグラフィーにより、(4) 生化学的解析は  $\alpha$ -グルコシダーゼ(商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社)処理の後、実験 3 - 1 に記載の HPLC により、(5) 結合様式の推定は常法によるメチル化分析により、(6) 比旋光度の測定は常法 10 により、(7)  $^{13}\text{C}$ -NMR は常法により行った。結果を以下に示す。

副生成物 1 は、質量数 810 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、副生成物 1 は D-グルコース 5 分子からなると考えられた。 $\alpha$ -グルコシダーゼ処理によって、環状四糖とグルコースを等モル生成した。メチル化分 15 析では、2, 3-ジメチル化物、2, 3, 4-トリメチル化物、2, 4, 6-トリメチル化物、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチル化物が 0.83 : 1.02 : 1.69 : 1 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 2 : 1 と考えられた。比旋光度は  $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 246^{\circ}$  であった。 $^{13}\text{C}$ -NMR では第 4 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの 20 帰属は、実験 3 - 4 及び実験 4 - 3 における他の糖質についての帰属の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 4 に示している。

以上の結果から、副生成物 1 を化学式 1 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

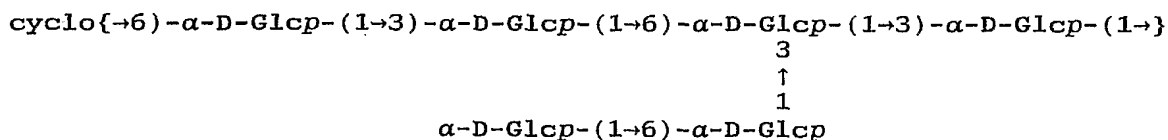
化学式1:



副生成物 2 は、質量数 972 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖はD-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、副生成物 2 はD-グルコース 6 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチル化物、2, 3, 4-トリメチル化物、2, 4, 6-トリメチル化物、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチル化物が 0.94 : 2.01 : 1.72 : 1 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 2 : 1 と考えられた。比旋光度は  $[\alpha]^{25}_D + 246^\circ$  であった。<sup>13</sup>C-NMR では第 5 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 3-4 及び実験 4-3 における他の糖質についての帰属の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 4 に示している。

以上の結果から、副生成物 2 を化学式 3 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式3:

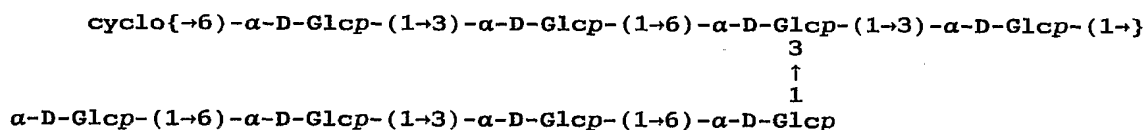


副生成物 3 は、質量数 1296 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖はD-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、副生成物 3 はD-グルコース 8 分子からなると考えられた。<sup>13</sup>C-NMR で

は第 6 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 3 - 4 及び実験 4 - 3 における他の糖質についての帰属の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 4 に示している。

以上の結果から、副生成物 3 を化学式 4 に示す構造を有する分岐環状  
5 四糖と同定した。

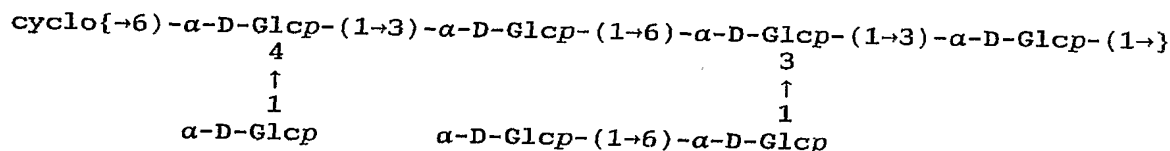
化学式4:



副生成物 4 は、質量数 1 1 3 4 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、副生成物 4 は D-グルコース 7 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 3-ジメチル化物、2, 4-ジメチル化物、2, 3, 4-トリメチル化物、2, 4, 6-トリメチル化物、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチル化物が、0.78 : 0.78 : 1.47 : 1.60 : 2 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 1 : 2 : 2 と考えられた。<sup>13</sup> C-NMR では第 7 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 3-4 及び実験 4-3 における他の糖質についての帰属の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 4 に示している。

以上の結果から、副生成物 4 を化学式 5 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式5:



- 以上実験 3 - 4 で同定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖ならびに結合様式を総合すると、実験 3 - 1 の酵素反応による場合、副生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を示すと考えられる。すなわち、該
- 5 分岐環状四糖は、一般式 1 に示される基本構造を有し、一般式 1 における  $R_1$  乃至  $R_{12}$  の 1 個又は 2 個以上が、置換基を有することのある  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  6) - {  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  6) - }<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-グルコピラノシル基 (ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに
- 10 独立しているものとする。) であり、比較的多くの場合は、 $R_2$  及び/又は  $R_8$  が  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  6) - {  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  6) - }<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-グルコピラノシル基 (ただし、n は 0 以上の整数を意味し、
- 15  $R_2$  及び  $R_8$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である。

実験 4 : 単離酵素による環状四糖へのグリコシル転移

実験 4 - 1 :  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によるグリコシル

20 転移

実験 3 - 2 の方法で得た環状四糖を 20 % (w/w) で、マルトペン

タオース（株式会社林原生物化学研究所製造）を10%（w/w）で含む10mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に、実験2-3の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトペンタオース1gあたり3単位加えて、30℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液をpH5.0に調製した後、反応液中の固形物1gあたり500単位のグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）500単位を加え、50℃で1時間反応させ、その後、反応液を10分間煮沸して酵素を失活させた。

10 グルコアミラーゼ処理後の反応液を、常法により、メンブラン濾過、脱塩した後、実験3-1に示したHPLCにより分析した。HPLCでの保持時間により実験3-3及び実験3-4で単離・同定した分岐環状四糖との異同を調べたところ、この反応液には、全糖質あたり、化学式1で表される分岐環状四糖が17.3%（HPLCにおけるピーク面積比による）含まれていることが判明した。この結果は、環状四糖に $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させることにより本発明の分岐環状四糖を効率よく生成させることができることを示している。

#### 実験4-2： $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素によるグリコシル転移

20 実験3-2の方法で得た環状四糖を20%（w/w）で、パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）を10%（w/w）で含む10mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に、実験2-2の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素をパノース1gあたり30単位加えて、30℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

25

この反応液を、常法により、メンブラン濾過、脱塩した後、実験 3-1 に示した HPLC により分析した。HPLC での保持時間により実験 3-3 及び実験 3-4 で単離・同定した分岐環状四糖との異同を調べたところ、この反応液には、全糖質あたり、化学式 3 で表される分岐環状四糖が 4.9% (HPLC におけるピーク面積比による) 含まれていることが判明した。この結果は、環状四糖に  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させることにより本発明の分岐環状四糖を効率よく生成させることができることを示している。

10 実験 4-3 : シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) によるグリコシル転移

実験 4-3 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 10 g と  $\alpha$ -シクロデキストリン (株式会社林原生物化学研究所製造) 10 g を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 30 g に溶解し、バチルス・ステアロサーモフィラスの CGTase (株式会社林原生物化学研究所製造) を  $\alpha$ -シクロデキストリン 1 g あたり 10 単位加えて 50℃ で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液に 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 350 g とグルコアミラーゼ (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売) 2000 単位を加え、40℃ で 4 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の方法で得た CGTase による反応液及び、CGTase に続いてグルコアミラーゼを作用させた反応液を実験 3-1 に示した HPLC により分析した。別途、これと同じ条件で、環状四糖及びグルコース



を分析し、両反応液中に含まれる成分の特定を試みた。C G T a s e 反応液の分析結果を第 8 a 図に、グルコアミラーゼ反応液の分析結果を第 8 b 図にそれぞれ示す。

第 8 a 図及び第 8 b 図に共通して認められる保持時間約 10 分のピーク X は環状四糖のピークであり、第 8 b 図に特有の保持時間約 6 分のピーク G はグルコースのピークである。第 8 a 図及び第 8 b 図に示すとおり、C G T a s e 反応液には、環状四糖より保持時間の長い諸種の新たな成分が含まれ（第 8 a 図）、グルコアミラーゼ反応液においては、これらの成分は、2 つの成分（ピーク 1 及びピーク 2）を除いてほぼ完全に消失していた（第 8 b 図）。以上の結果は、第 8 a 図に認められる環状四糖以外のピークは、環状四糖にグルコシル基が 1 個以上結合したグリコシル誘導体のピークであり、第 8 b 図において環状四糖より長い保持時間の位置に認められる 2 個のピーク（ピーク 1 及びピーク 2）は、環状四糖に対して、グルコシル基が 1 箇所に 1 個結合したグルコシル誘導体であることを示唆している。グルコアミラーゼ反応液中のこれら 2 個の成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 3 に示す。

表 3 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
18.7	C G T a s e 生成物 1	約35%
38.7	C G T a s e 生成物 2	約22%

\*, いずれもおおよその値である。

\*\*, 認められた全てのピークの面積の合計を 100 としたときの相対値。

## 実験 4 - 3 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4 - 3 (a) の方法で得たグルコアミラーゼ反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン P K 2 1 8』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『I R A 4 1 1』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験 3 - 2 に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験 3 - 1 に示した H P L C で分析し、C G T a s e 生成物 1 及び 2 をそれぞれ純度 9 7 % 以上で含む画分を採取した。

上記の C G T a s e 生成物 1 の高含有画分を常法により  $^{13}\text{C}$ -NMR に供したところ、得られたスペクトルは、実験 3 - 4 に結果を示した副生成物 1（化学式 1）の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル（第 4 図）と一致した。このことから、C G T a s e 生成物 1 を、化学式 1 で表される分岐環状四糖と同定した。

上記の C G T a s e 生成物 2 の高含有画分を実験 3 - 4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。C G T a s e 生成物 2 は、質量数 9 7 2 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D - グルコースのみであり、質量数を考慮すると、同生成物は D - グルコース 6 分子からなると考えられた。α - グルコシダーゼ処理によって、環状四糖とグルコースを 1 : 2 のモル比で生成した。メチル化分析では、2, 3 - ジメチル化物、2, 4, 6 - トリメチル化物、及び 2, 3, 4, 6 - テトラメチル化物が 0. 8 9 : 1 : 1. 2 4 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 1 と考えられた。比旋光度は  $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 241^{\circ}$  であった。 $^{13}\text{C}$ -NMR では第 9 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属を、上記実験 3 - 4 で述べた他の糖質ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて表 4 に示す。

表 4 :

(その1)

炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	副生成物1*	副生成物2*	副生成物3*	副生成物4*	CGTase2*
1a	99.34	99.24	99.46	99.40	99.44	99.49
2a	74.28	75.49	72.84	72.87	72.80	75.72
3a	75.45	75.75	82.47	82.98	82.45	75.98
4a	73.35	81.18	73.81	73.72	73.76	81.38
5a	72.78	71.14	72.45	72.46	72.38	71.34
6a	70.22	70.27	70.17	70.10	69.98	70.47
1b	101.20	101.18	101.17	101.08	101.13	101.43
2b	72.64	72.71	72.64	72.63	72.58	72.91
3b	77.31	77.58	77.23	77.13	77.26	77.93
4b	73.62	73.58	73.62	73.65	73.52	73.76
5b	74.23	74.22	74.25	74.28	74.20	74.42
6b	62.88	62.87	62.88	62.87	62.84	63.08
1c	—	99.35	99.32	99.28	99.18	—
2c	—	74.22	74.25	74.28	75.47	—
3c	—	75.49	75.45	75.43	75.77	—
4c	—	73.34	73.36	73.37	81.14	—
5c	—	72.71	72.78	72.75	71.09	—
6c	—	70.15	70.08	70.00	70.20	—
1d	—	101.18	101.17	101.08	101.13	—
2d	—	72.65	72.64	72.63	72.66	—
3d	—	77.37	77.23	77.04	77.51	—
4d	—	73.58	73.57	73.58	73.52	—
5d	—	74.22	74.25	74.28	74.20	—
6d	—	62.87	62.88	62.87	62.84	—

(続きあり)

\*, 副生成物1乃至4は実験3-3で単離した副生成物1乃至4を示し、CGTase2は実験4-3(b)で単離したCGTase生成物2を示している。

(その2)

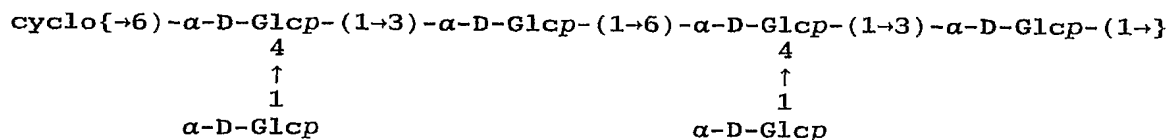
炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	副生成物1*	副生成物2*	副生成物3*	副生成物4*	CGTase2*
1e	—	102.14	100.59	100.50	100.54	102.34
2e	—	74.40	74.25	74.28	74.20	74.60
3e	—	75.62	75.82	75.85	75.77	75.81
4e	—	72.23	72.16	72.02	72.12	72.43
5e	—	74.10	73.10	73.08	73.05	74.33
6e	—	63.38	68.18	67.85	68.14	63.58
1f	—	—	101.84	102.17	101.79	—
2f	—	—	74.25	72.63	74.20	—
3f	—	—	75.82	82.98	75.77	—
4f	—	—	72.25	72.87	72.20	—
5f	—	—	74.50	74.28	74.45	—
6f	—	—	63.18	62.87	63.13	—
1g	—	—	—	100.50	102.11	—
2g	—	—	—	74.28	74.36	—
3g	—	—	—	75.85	75.57	—
4g	—	—	—	72.24	72.20	—
5g	—	—	—	72.99	74.06	—
6g	—	—	—	67.85	63.33	—
1h	—	—	—	102.17	—	—
2h	—	—	—	74.28	—	—
3h	—	—	—	75.92	—	—
4h	—	—	—	72.24	—	—
5h	—	—	—	74.51	—	—
6h	—	—	—	63.16	—	—

(以上)

\*, 副生成物1乃至4は実験3-3で単離した副生成物1乃至4を示し、CGTase2は実験4-3(b)で単離したCGTase生成物2を示している。

以上の結果から、CGTase生成物2を化学式2に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式2:



- 5 以上実験4-3(b)で同定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖ならびに結合様式、実験4-3(a)に示した酵素反応後のHPLC分析結果を総合すると、実験4-3(a)の酵素反応による場合、生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を示すと考えられる。すなわち、該

分岐環状四糖は一般式 1 で表される基本構造を有し、一般式 1 における  $R_1$  乃至  $R_{12}$  の 1 個又は 2 個以上、比較的多くの場合、 $R_1$  及び／又は  $R_7$  が、置換基を有することのある  $\{\alpha-D\text{-グルコピラノシル-}(1\rightarrow4)\}_n \alpha-D\text{-グルコピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。) である。

実験 4-4 : バチルス・サーキュランズの  $\beta$ -ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

#### 10 実験 4-4 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 20 g とラクトース (試薬特級、和光純薬工業株式会社製造) 20 g を 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 93.3 g に溶解し、バチルス・サーキュランズの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (商品名『ビオラクタン 5』、大和化成株式会社製造) をラクトース 1 g あたり 3 単位加えて 40℃ で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3-1 に示した HPLC により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖 (保持時間約 10 分) とは保持時間の異なる新たな成分の生成が少なくとも 3 種類認められた。この 3 種類の新たに認められた成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 5 に示す。

表 5 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
14.0	$\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 1	12.2%
19.7	$\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 2	2.9%
20.3	$\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 3	1.1%

\*, いずれもおおよその値である。

\*\*, 認められた全てのピークの面積の合計を100としたときの相対値。

#### 実験4-4 (b) : 反応生成物の単離と同定

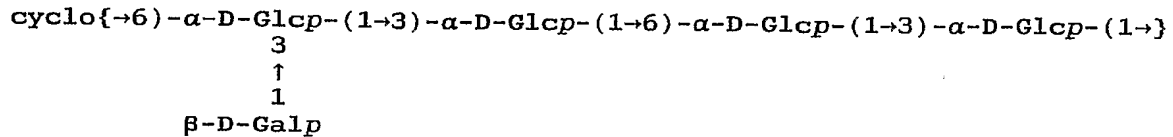
実験4-4 (a) の方法で得た反応液に水酸化ナトリウム4.8gを  
 5 加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法  
 により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供し  
 た。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR355-  
 15AQ, S-10/20 $\mu$ m, 120A』(株式会社ワイエムシー製  
 造)を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に  
 10 記載のHPLCにより分析し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物1を純度9  
 7%以上で含む画分を採取した。

上記の画分を実験3-4に示した7項目の分析に準じて分析した。 $\beta$ -  
 ガラクトシダーゼ生成物1は、質量数810であり、実質的に非還元  
 性の糖質であった。構成糖はD-グルコースとD-ガラクトースであり  
 15 、その構成比は4:1であった。質量数を考慮すると、同生成物はD-  
 グルコース4分子とD-ガラクトース1分子からなると考えられた。比  
 旋光度は $[\alpha]^{25}_D + 200^\circ$ であった。 $^{13}\text{C}$ -NMRでは第10図に  
 示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験4-5乃至実験4  
 -7における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせ

て後記表 7 に示している。

以上の結果から、 $\beta$ -グルコシダーゼ生成物 1 を化学式 6 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式 6:



5

実験 4-5 : アスペルギルス・ニガーの  $\beta$ -ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

実験 4-5 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 20 g とラクトース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製造）20 g を 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）93.3 g に溶解し、アスペルギルス・ニガーの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ（商品名『ラクターゼ Y A-O』、ヤクルト薬品工業株式会社製造）をラクトース 1 g あたり 10 単位加えて 40℃ で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3-1 に示した HPLC により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖（保持時間約 10 分）とは保持時間の異なる新たな成分の生成が少なくとも 3 種類認められた。この 3 種類の新たに認められた成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 6 に示す。

20 表 6 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
14.1	化学式6 ***	3.3%
15.1	$\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4	0.7%
19.1	$\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物5	7.1%

\*, いずれもおおよその値である。

\*\*, 認められた全てのピークの面積の合計を100としたときの相対値。

\*\*\*, 保持時間により、実験4-4(b)に示した化学式6で表される分岐環状オリゴ糖と同定した。

#### 実験4-5 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験4-5 (a)の方法で得た反応液に水酸化ナトリウム4.8gを加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR355-15AQ, S-10/20 $\mu$ m, 120A』(株式会社ワイエムシー製造)を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4を純度94%以上で含む画分と、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物5を純度99%以上で含む画分を採取した。

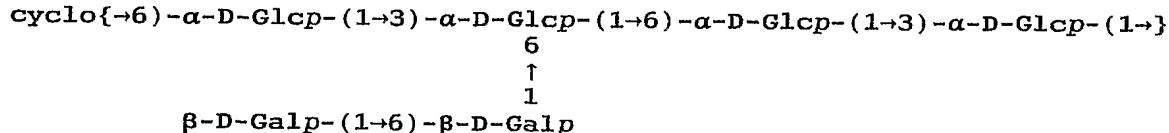
上記の $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4の高含有画分を実験3-4に示した7項目の分析に準じて分析した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4は、質量数973であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖はD-グルコースとD-ガラクトースであり、その構成比は2:1であった。質量数を考慮すると、同生成物はD-グルコース4分子とD-ガラク



トース 2 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、2, 4, 6-トリメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルガラクトース、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチルガラクトースが、1 : 1.86 : 0.96 : 1.34 : 1.12 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 1 : 1 : 1 と考えられた。<sup>13</sup>C-NMR では第 11 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 4-5 乃至実験 4-7 における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 7 に示している。

10 以上の結果から、 $\beta$ -グルコシダーゼ生成物 4 を化学式 8 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式8:

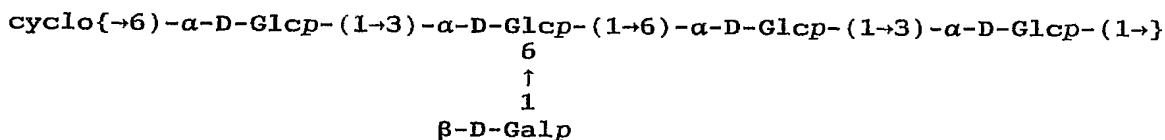


上記で得た  $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 5 の高含有画分を実験 3-4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 5 は、質量数 810 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと D-ガラクトースであり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と D-ガラクトース 1 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、2, 4, 6-トリメチルグルコース、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチルガラクトースが、1 : 2.02 : 1.00 : 1.04 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 1 : 1 と考えられた。 $^{13}\text{C}$ -NMR では第 12 図

に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 4-5 乃至実験 4-7 における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 7 に示している。

以上の結果から、 $\beta$ -グルコシダーゼ生成物 5 を化学式 7 に示す構造  
5 を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式7:



以上実験 4-5 (b) で同定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖  
ならびに結合様式を総合すると、実験 4-5 (a) の酵素反応による場  
合、生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を示すと考えられる。す  
なわち、該分岐環状四糖は一般式 1 で表される基本構造を有し、一般式  
1 における  $R_1$  乃至  $R_{12}$  の 1 個又は 2 個以上、比較的多くの場合、 $R_6$  及  
び／又は  $R_{12}$  が、置換基を有することのある  $\{\beta-D\text{-ガラクトピラノ}$   
 $\text{シル}-(1\rightarrow6)-\}_n \alpha-D\text{-ガラクトピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は  
0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場  
合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。) である。

実験 4-6:  $\alpha$ -ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

実験 4 - 6 (a) : 酵素反応

20 実験 3-2 の方法で得た環状四糖 5 g とメリビオース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製造） 5 g を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH

5. 0) 15 g に溶解し、モルティエレラの  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ（商品名『メリビアーゼ』、北海道糖業株式会社製造）をメリビオース 1 g あたり 100 単位加えて 40℃ で 30 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

- 5 上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3-1 に示した HPLC により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖（保持時間約 10 分）とは保持時間の異なる、保持時間 13.3 分の、少なくとも 1 種類の新たな成分の生成が認められた。この HPLC 分析において、全ピーク面積に対する新たに認められた成分のピーク面積の百分率は約 1.0% で
- 10 あった。

#### 実験 4-6 (b) : 反応生成物の単離と同定

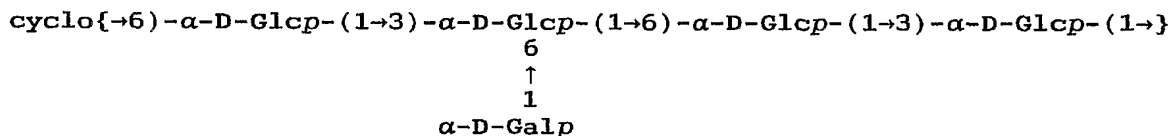
- 実験 4-6 (a) の方法で得た反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、実験 4-5 (b) の方法にしたがって分取用液体クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、
- 15 上記で確認した  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ生成物を純度 98% 以上で含む画分を採取した。

- 上記の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ生成物の高含有画分を実験 3-4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 4 は、
- 20 質量数 810 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと D-ガラクトースであり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と D-ガラクトース 1 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、2, 4, 6-トリ
- 25 メチルグルコース、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチルガラクトースが

、1 : 2. 09 : 1. 02 : 1. 02 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 1 : 1 と考えられた。<sup>13</sup>C-NMR では第 13 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 4-5 乃至実験 4-7 における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 7 に示している。

以上の結果から、本実験で得た  $\alpha$ -グルコシダーゼ生成物を化学式 9 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式9:



10 実験 4-7: リゾチームによるグリコシル転移

実験 4-7 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 20 g とキチンオリゴ糖（商品名『NA-COS-Y』、焼津水産化学工業株式会社製造、重合度 2 乃至 6 のキチンオリゴ糖を乾燥重量換算で約 55 % 含む）10 g を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）45 g に溶解し、卵白リゾチーム（生化学工業株式会社製造）を 2.8 g 加えて 60 °C で 9 日間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液を、HPLCの前処理として、遠心分離し、その上清を限外濾過膜（商品名『SEP-0013』、旭化成工業株式会社製造）を用いて濾過して除タンパクした後、常法により脱塩した。この前処理液と環状四糖の水溶液とを実験3-1に示したHPLCにより分析した。

。その結果、反応液中に、環状四糖（保持時間約 10 分）とは保持時間の異なる、保持時間 36.6 分の、少なくとも 1 種の新たな成分の生成が認められた。この HPLC 分析において、全ピーク面積に対する新たに認められた成分のピーク面積の百分率は約 7.3 % であった。

5

実験 4-7 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4-7 (a) の方法で得た反応液を、実験 4-7 (a) に記載の HPLC の前処理と同様に処理した後、実験 4-5 (b) の方法にしたがって分取用液体クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、上記で確認したリゾチーム生成物を純度 99 % 以上で含む画分を採取した。

上記のリゾチーム生成物の高含有画分を実験 3-4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。リゾチーム生成物は、質量数 851 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと N-アセチル-D-グルコサミン (N-アセチル-D-キトサミン) であり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と N-アセチル-D-グルコサミン 1 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、及び 2, 4, 6-トリメチルグルコースが、1.02 : 1 : 1.67 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 2 と考えられた。比旋光度は  $[\alpha]^{25}_D + 24.6^\circ$  であった。 $^{13}\text{C}$ -NMR では第 14 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属を、上記実験 4-4 乃至 4-6 で述べた他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて表 7 に示す。

25 表 7 :

(その1)

炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	$\beta$ -Gal1*	$\beta$ -Gal4*	$\beta$ -Gal5*	$\alpha$ -Gal*	Lys*
1a	99.34	98.96	99.39	99.36	99.25	99.47
2a	74.28	73.67	74.27	74.24	74.28	72.48
3a	75.45	83.59	75.45	75.42	75.44	84.53
4a	73.35	73.11	73.28	73.24	73.42	74.03
5a	72.78	72.44	72.76	72.76	72.60	72.57
6a	70.22	70.06	70.38	70.35	70.10	70.18
1b	101.20	101.04	101.22	101.27	101.07	101.13
2b	72.64	72.60	72.65	72.62	72.60	72.69
3b	77.31	77.29	77.37	77.36	77.35	77.22
4b	73.62	73.62	73.34	73.31	73.61	73.65
5b	74.23	74.21	73.46	73.45	72.79	74.23
6b	62.88	62.86	70.66	70.59	67.94	62.84
1c	—	99.21	99.39	99.36	99.25	99.31
2c	—	74.26	74.27	74.24	74.28	74.28
3c	—	75.41	75.45	75.42	75.44	75.44
4c	—	73.34	73.22	73.24	73.35	73.35
5c	—	72.70	72.76	72.73	72.60	72.77
6c	—	70.06	70.22	70.20	70.10	70.18

(続きあり)

\*,  $\beta$ -Gal1は実験4-4(b)で単離した $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物1を、 $\beta$ -Gal4及び5は実験4-5(b)で単離した $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4及び5を、 $\alpha$ -Galは実験4-6(b)で単離した $\alpha$ -ガラクトシダーゼ生成物を、Lysは実験4-7(b)で単離したリゾチーム生成物をそれぞれ示している。

(その2)

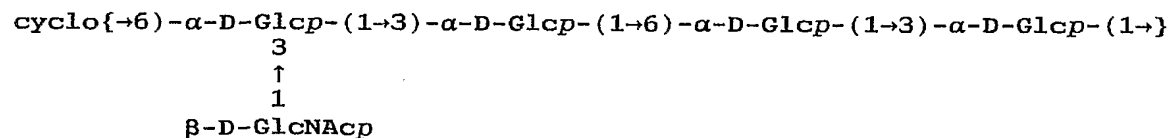
炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	$\beta$ -Gal1*	$\beta$ -Gal4*	$\beta$ -Gal5*	$\alpha$ -Gal*	Lys*
1d	—	100.95	101.22	101.21	100.96	101.13
2d	—	72.54	72.57	72.54	72.60	72.63
3d	—	77.03	77.24	77.21	77.18	77.22
4d	—	73.53	73.34	73.31	73.61	73.60
5d	—	74.21	74.27	74.24	74.22	74.23
6d	—	62.86	62.88	62.86	62.87	62.84
1e	—	107.57	105.93	106.01	100.55	—
2e	—	74.08	73.42	73.58	71.20	—
3e	—	75.18	75.26	75.42	72.29	—
4e	—	71.46	71.37	71.34	71.97	—
5e	—	78.02	76.57	77.83	73.75	—
6e	—	64.18	71.60	63.70	63.87	—
1f	—	—	106.02	—	—	104.66
2f	—	—	73.62	—	—	58.43
3f	—	—	75.45	—	—	76.38
4c	—	—	71.31	—	—	71.86
5f	—	—	77.87	—	—	78.52
6f	—	—	63.67	—	—	63.38
CO	—	—	—	—	—	177.58
CH <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	24.92

(以上)

\*,  $\beta$ -Gal1は実験4-4(b)で単離した $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物1を、 $\beta$ -Gal4及び5は実験4-5(b)で単離した $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物4及び5を、 $\alpha$ -Galは実験4-6(b)で単離した $\alpha$ -ガラクトシダーゼ生成物を、Lysは実験4-7(b)で単離したリゾチーム生成物をそれぞれ示している。

以上の結果から、本実験で得たリゾチーム生成物を化学式10に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式10:



## 実験5：分岐環状四糖の結晶

実験3-3の方法で得た副生成物1（化学式1で表される分岐環状四

糖。以下、化学式番号をもって、本発明による個々の分岐環状四糖を示すものとする。) 及び副生成物 2 (化学式 3)、実験 4-3 (b) の方法で得た C G T a s e 生成物 2 (化学式 2)、実験 4-4 (b) の方法で得た  $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 1 (化学式 6)、実験 4-5 (b) の方法で得た  $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成物 5 (化学式 7) のそれぞれの高含有画分を濃縮したところ、いずれも結晶の析出が認められた。十分に結晶を析出させた後、個々に、常法により分蜜して結晶を採取した。採取した結晶を常温で乾燥させ、以上 5 種類の分岐環状四糖の結晶粉末を得た。実験 3-1 に示した H P L C で分析したところ、化学式 1、化学式 2、化学式 6 及び化学式 7 の結晶は純度 99% 以上、化学式 3 の結晶の純度は 98% 以上であった。

上記で得た結晶粉末を結晶の形状、X線回折、色、水分、融点、熱特性の全て又は一部についてそれぞれ調べた。結晶の形状は光学顕微鏡により観察した。X線回折は、通常の粉末X線回折法により調べた。水分はカールフィッシャー法により、融点は市販の融点測定装置(商品名『MP-21型』、ヤマト科学株式会社製造)により測定した。熱特性は、市販のデジタル熱分析計(商品名『TG/DTA220型』、セイコー電子工業株式会社製造)を用いて熱重量分析を行うことにより調べた。

化学式 1、化学式 2 及び化学式 3 を顕微鏡で観察したところ、化学式 1 は柱状、化学式 2 は針状、化学式 3 は柱状であった。

上記の全ての結晶のX線回折図形を、それぞれ、第15図乃至第19図に示す。X線回折において認められた主たる回折角( $2\theta$ )と、色、水分、融点について調べた結果とともに表8にまとめて示す。

表 8 :



	主たる回折角 ( $2\theta$ )	色	水分	1分子あたりの 結晶水の数*	融点
化学式 1	8.1°, 12.2°, 14.2°, 15.4°	白	11.1%	5乃至6	270℃付近で分解 し、測定できず
化学式 2	5.6°, 8.8°, 16.9°, 21.9°	白	17.5%	11乃至12	280℃付近で分解 し、測定できず
化学式 3	7.9°, 12.1°, 17.9°, 20.2°	白	15.8%	10乃至11	275℃付近で分解 し、測定できず
化学式 6	11.0°, 12.3°, 12.8°, 24.9°	白	17.1%	9乃至10	93℃
化学式 7	8.7°, 13.0°, 21.7°, 26.1°	白	11.0%	5乃至6	245℃付近で分解 し、測定できず

\*, 水分の測定値をもとに求めた。

上記の全ての結晶の熱特性についての分析結果を、それぞれ、第20  
図乃至第24図に示す。第20図に示すとおり、化学式1は、150℃  
までの上昇により4分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、  
5 300℃前後からは化学式1自体の熱分解と考えられる重量減少が観察  
された。このことから、化学式1の5乃至6含水結晶は、常圧において  
温度を150℃まで上昇させると、1分子あたり1乃至2分子の結晶水  
を含む結晶に変換されると考えられる。

第21図に示すとおり、化学式2は、昇温に伴って、約150℃まで  
10 に6乃至7分子の水に相当する重量減少が認められた。さらに、300  
℃前後からは化学式2自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。  
このことから、化学式2の11乃至12含水結晶は、常圧において温  
度を150℃まで上昇させると、1分子あたり4乃至5分子の結晶水  
を含む結晶に変換されると考えられる。

第22図に示すとおり、化学式3は、昇温に伴って、約110℃までに6乃至7分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式3自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式3の10乃至11含水結晶は、常圧において温度を110℃まで上昇させると、1分子あたり3乃至4分子の結晶水を含む結晶に変換されると考えられる。

第23図に示すとおり、化学式6は、昇温に伴って、約120℃までに7乃至8分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式6自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式6の9乃至10含水結晶は、常圧において温度を120℃まで上昇させると、1分子あたり1乃至2分子の結晶水を含む結晶に変換されると考えられる。

第24図に示すとおり、化学式7は、昇温に伴って、約130℃までに5乃至6分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式7自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式7の5乃至6含水結晶は、常圧において温度を130℃まで上昇させると、1分子あたり0乃至1分子の結晶水を含む結晶に変換されると考えられる。

20 実施例A-1：化学式1及び2で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖1重量部と $\alpha$ -シクロデキストリン（株式会社林原生物化学研究所製造）1重量部を50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）3重量部に溶解し、バチルス・ステアロサーモフィラスのCGTase（株式会社林原生物化学研究所製造）を $\alpha$ -シクロデキストリン1gあたり10単位加えて50℃で24時間反応させ

、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液に50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）350gを加え、さらに、グルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を $\alpha$ -シクロデキストリンの始発添加量1gあたり200単位加え、40℃で4時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の酵素失活後の反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオンPK218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA411』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験3-2に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験3-1に示したHPLCで分析し、化学式1及び化学式2で表される分岐環状四糖をそれぞれ純度85%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約50%（w/w）のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

## 20 実施例A-2：化学式3で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖2重量部、パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）1重量部、及び10mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）7重量部を混合、溶解し、実験2-2の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素をパノース1gあたり30単位加えて、30℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活

させた。

この酵素失活後の反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオンPK218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA411』、オルガノ株式会社製造）を用いて  
5 脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験3-2に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験3-1に示したHPLCで分析し、化学式3で表される分岐環状四糖を純度80%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約40%（w/w）のシラップを得た。

10 本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 15 実施例A-3：化学式6で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖2重量部、ラクトース2重量部、及び20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）9重量部を混合、溶解し、バチルス・サーキュランズのβ-ガラクトシダーゼ（商品名『ビオラクタン5』、大和化成株式会社製造）をラクトース1gあたり3単位  
20 加えて40℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

この酵素失活後の反応液に水酸化ナトリウム0.5重量部加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用  
25 カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR355-15AQ,

S-10/20  $\mu$ m, 120 Å』（株式会社ワイエムシー製造）を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、化学式6で表される分岐環状四糖を純度85%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約40%（w/w）のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

10

実施例A-4：化学式7で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖2重量部、ラクトース2重量部、及び20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）9重量部に溶解し、アスペルギルス・ニガーの $\beta$ -ガラクトシダーゼ（商品名『ラクターゼY A-O』、ヤクルト薬品工業株式会社製造）をラクトース1gあたり10単位加えて40℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

この酵素失活後の反応液に水酸化ナトリウム0.5重量部を加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR 355-15 ÅQ, S-10/20  $\mu$ m, 120 Å』（株式会社ワイエムシー製造）を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、化学式7で表される分岐環状四糖を純度85%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約45%

25

(w/w) のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例 A-5：化学式 1 及び 2 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-1 にしたがって、CGTase 反応に続いてグルコアミラーゼ反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-1 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 1 及び 2 で表される分岐環状四糖を純度 97% 以上で含む画分をそれぞれ採取した。採取した画分を濃縮後、それぞれに、実験 5 で得た化学式 1 及び 2 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 1 及び化学式 2 で表される分岐環状四糖それぞれの結晶（いずれも純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定により、化学式 1 の結晶が 5 乃至 6 含水であり、化学式 2 の結晶が 11 乃至 12 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例 A-6：化学式 3 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-2 にしたがって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-2 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 3 で表される

分岐環状四糖を純度 97% 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 3 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 3 で表される分岐環状四糖の結晶（  
5 純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 10 乃至 11 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 10 実施例 A-7：化学式 6 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-3 にしたがって、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素による反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-3 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 6 で表される分岐環状四糖を純度 96% 以上で含む画分を採取した。採  
15 取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 6 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 6 で表される分岐環状四糖の結晶（純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 9 乃至 10 含水であることを確認した。

20 本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例 A-8：化学式 7 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-4 にしたがって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによる反応を行い  
25 、酵素失活させた反応液を、実施例 A-4 と同様にクロマト分離に供し

た。溶出液を実験 3 - 1 に記載の H P L C により分析し、化学式 7 で表される分岐環状四糖を純度 9 7 % 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 7 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、  
5 採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 7 で表される分岐環状四糖の結晶（純度 9 9 % 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 5 乃至 6 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

10

#### 実施例 A - 9 : 分岐環状四糖含有シラップ

3 . 7 k g の澱粉部分分解物（商品名『パインデックス # 1 0 0 』、松谷化学工業株式会社製造）を、3 5 L の 1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液（p H 6 . 0 ）に溶解し、この溶液に、実験 2 - 1 の方法で得た酵素  
15 剤を、環状四糖生成活性として 1 7 , 5 0 0 単位相当加え、3 0 ° C で 2 日間保持して反応させ、その後反応液を 2 0 分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を 4 5 ° C に調整した後、1 1 g （1 3 7 , 5 0 0 単位）の  $\alpha$  - アミラーゼ剤（商品名『ネオスピターゼ P K 2 』、ナガセ生化学工業株式会社製造）及び 4 4 g （1 4 0 , 8 0 0 単位）のグルコアミ  
20 ラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製造）を加え、p H 6 . 0 に調整した後、4 5 ° C で 1 日間保持して反応させ、その後反応液を 2 0 分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を常法により濾過し、濾液を逆浸透膜を用いて固形物濃度約 1 6 % （w / w ）にまで濃縮した。この濃縮液を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃  
25 縮して、固形物当り分岐環状四糖 1 2 % 、環状四糖 4 4 % 、グルコース



25%、及びオリゴ糖19%からなる固形分を3.5kg含むシラップを約6.1kg得た。

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できる難晶性（出性）のシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例A-10：分岐環状四糖含有シラップ

実験3-1の方法で得た糖液6.1kgを、イオン交換樹脂（商品名『アンバーライトCR-1310』、Na型、オルガノ製造、樹脂量約225L）を充填したカラム（内径13.5cm×長さ160cmのカラムを10本直列に連結）を用いてクロマト分離に供した。移動相には水（流速45L/h）を用い、カラム温度は60℃とした。カラムからの溶出液を分画し、各画分の糖組成を実験3-1に示したHPLCにより求めた。環状四糖を比較的多く含む画分を合一し、1530gの固形物を含む糖液を得た。上記と同じ条件によるHPLCで分析し、ピーク面積に基づいて計算したところ、この合一した画分（環状四糖高含有画分）は、全糖質当り、環状四糖を79.8%、イソマルトースを6.1%の割合で含むものであった。

環状四糖高含有画分の固形物として1,310g相当を、pH5.0、50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物1g当り1000単位とグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物1g当り60単位添加して20時間処理した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、カチオン

交換樹脂（商品名『ダイヤイオンPK218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA411』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を上記のクロマト分離の条件にしたがって分画し、環状四糖の純度が97%以上の画分を採取した。採取した画分を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮し、固形物約1,260gを含む糖液を得た。この糖液を、固形物濃度約50%（w/w）に調整した後、円筒状のプラスチック容器に入れ、穏やかに回転させながら、温度を65℃から20℃にまで約20時間かけて降下させて結晶を析出させ、常法にしたがって分密し、得られる母液を精製・濃縮して、固形分当り分岐環状四糖4%、環状四糖94%、グルコース1%、及びその他の糖質1%からなる固形物濃度約45%のシラップを得た。

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できる難晶出性のシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例A-11：分岐環状四糖含有シラップ

実施例A-9で得た分岐環状四糖含有シラップ（400g）を常法に従って、アルカリ展開したラネーニッケル（商品名『N154』、日揮化学社製）を固形物グラム当たり0.1グラム加えオートクレーブに入れ、水素圧を100kg/cm<sup>2</sup>に保ち、100℃にて4時間攪拌して、続いて120℃にて2時間攪拌して水素添加を行った。放冷後、オートクレーブから水素添加物を取り出し、厚さ約1cmの活性炭層に通液することでラネーニッケルを濾過除去し、得られる濾液を、常法に従っ

て、活性炭で脱色し、H形及びOH形イオン交換樹脂により脱塩し、精製し、更に、濃度約40%に濃縮し、固形物当り分岐環状四糖12%、環状四糖44%、ソルビトール25%、及びその他の糖質19%からなる実質的に非還元性で難晶出性のシラップを得た。

- 5        本品は、工業的に安価かつ容易に製造できるシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 実施例A-12：分岐環状四糖含有シラップ

- 10       実施例A-9で得た分岐環状四糖含有シラップ（400g）を実施例A-10で得た分岐環状四糖含有シラップ（400g）で置き換えた以外は実施例A-11と同様に処理して、固形物当り分岐環状四糖4%、環状四糖94%、ソルビトール1%、及びその他の糖質1%からなる固形物濃度約55%の実質的に非還元性で難晶出性のシラップを得た。

- 15       本品は、工業的に安価かつ容易に製造できるシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

#### 20    実施例B-1：甘味料

実施例A-5の方法で得た、化学式1で表される分岐環状四糖の5乃至6含水結晶0.8重量部に、トレハロース含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）0.2重量部、 $\alpha$ -グリコシルステビオ

シド（東洋精糖株式会社販売、商品名『 $\alpha$ G スイート』）0.01重量部、およびL-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（商品名『アスパルテーム』）0.01重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約2  
5 倍の甘味度を有している。本品のカロリーは、分岐環状四糖が難消化性、難発酵性で実質的に無カロリーであることから、甘味度当たり蔗糖の約10分の1である。しかも、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である。従って、本品は、高品質の低カロリー、低う蝕性甘味料として好適である。

10

#### 実施例B-2：ハードキャンディー

実施例A-3の方法で得た、化学式6で表される分岐環状四糖含有シラップ50重量部と、固形物濃度約55%（w/w）の蔗糖溶液100重量部を加熱しつつ混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加  
15 熱濃縮し、これにクエン酸0.6重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。本品は歯切れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起こさず、吸湿性少なく、ダレも起こさない安定で高品質のハードキャンディーである。

#### 20 実施例B-3：乳酸菌飲料

実施例A-4の方法で得た、化学式7で表される分岐環状四糖含有シラップ50重量部と、脱脂粉乳175重量部、及びラクトスクロース高含有粉末（株式会社林原商事販売、登録商標『乳果オリゴ』）50重量部を水1,150重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に  
25 冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部植菌し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好で、

オリゴ糖、環状四糖を含有し、乳酸菌を安定に保つだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用、整腸作用を有する乳酸菌飲料として好適である。

#### 実施例 B-4：練歯磨

- 5 実施例 A-1 の方法で得た、化学式 1 で表される分岐環状四糖含有シラップを固形物濃度約 30% (w/w) に調整した。このシラップ 15 重量部と第二リン酸カルシウム 45 重量部、ラウリル硫酸ナトリウム 1.5 重量部、グリセリン 25 重量部、ポオキシエチレンソルビタンラウレート 0.5 重量部、サッカリン 0.02 重量部および防腐剤 0.05 重量部を水 13 重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗淨力を落とすことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

#### 実施例 B-5：浴用剤

- 15 実施例 A-5 の方法で得た、化学式 2 で表される分岐環状四糖の 11 乃至 12 含水結晶 10 重量部に対してユズの皮ジュース 1 重量部の割合で混合し、乾燥させた後、粉末化して、ユズの皮エキス含有粉末を得た。本粉末 5 重量部に、焼塩 90 重量部、トレハロース含水結晶 2 重量部、無水ケイ酸 1 重量部および  $\alpha$ -グルコシルヘスペリジン（株式会社林原販売、商品名  $\alpha$ Gヘスペリジン）0.5 重量部を混合して浴用剤を得た。本品は、上品な香りを穏やかに呈し、皮膚の保湿性に優れた浴用剤である。

#### 実施例 B-6：化粧用クリーム

- 25 モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A-6 の方法で得た、

化学式 3 で表される分岐環状四糖の 10 乃至 11 含水結晶 2 重量部、 $\alpha$ -グルコシル ルチン（株式会社林原販売、商品名  $\alpha$  G ルチン） 1 重量部、流動パラフィン 1 重量部、トリオクタン酸グリセリン 10 重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これに L-乳酸 2 重量部、  
5、1, 3-ブチレングリコール 5 重量部および精製水 66 重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 10 実施例 B-7：錠剤

実施例 A-7 の方法で得た、化学式 6 で表される分岐環状四糖の 9 乃至 10 含水結晶 14 重量部と、アスピリン 50 重量部、及びコーンスターチ 4 重量部を十分に混合した後、常法に従って打錠機により打錠して厚さ 5.25 mm、1 錠 680 mg の錠剤を製造した。本品は、分岐環  
15 状四糖の賦形性を利用したもので、吸湿性が極めて低く、物理的強度も充分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

#### 産業上の利用の可能性

以上説明したとおり、本発明は、本発明者等が先に見出した新規酵素  
20、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とを澱粉部分分解物に作用させてたとき、環状四糖とともに、環状四糖のグリコシル誘導体が副生成すること、ならびに、環状四糖に上記の両酵素やシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、リゾチームなどの糖質関連  
25 酵素を作用させることによって、極めて多岐にわたるグリコシル誘導体

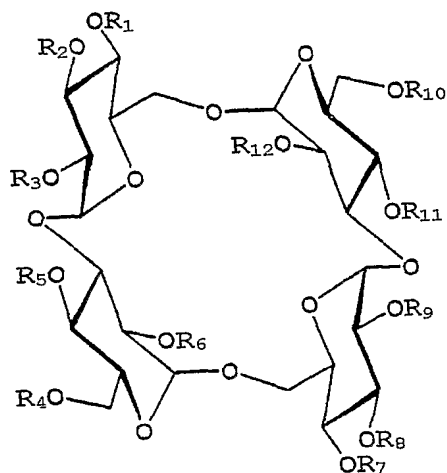
5 が得られることを見出した、本発明者等による全く独自の知見に基づくものである。本発明が提供するグリコシル誘導体、すなわち、分岐環状四糖は、物質の包接能や難消化性など環状四糖の本来の性質を有しているので、環状四糖と同様に飲食品、化粧品、医薬品などの諸分野で有利に利用するとができる。また、本発明の分岐環状四糖を用いて、その物性や機能についての解析を進めることにより、環状四糖の新たな用途開発や、環状四糖の性質・機能の改良につながる重要な知見が得られるといえる。

10 この発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 請求の範囲

1. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$  } で表される環状四糖のグリコシル誘導体であって、一般式1で表される構造を有する分岐環状四糖。

一般式1:



- (一般式1において、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 $R_1$ 乃至 $R_{12}$ の全てが水素原子であることはなく、また、 $R_4$ 及び $R_{10}$ のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である $R_4$ 又は $R_{10}$ はD-グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。)

2. 一般式1における $R_1$ 乃至 $R_{12}$ から選ばれる1個又は2個以上の位置にあるグリコシル基が、それぞれ独立に、下記(1)乃至(5)に示すグリコシル基から選ばれるいずれかの基である請求の範囲第1項に記



載の分岐環状四糖：

(1) 置換基を有することのある  $\{\alpha\text{-D-グルコピラノシルー}(1 \rightarrow 4) -\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場合、それぞれ  
5   の当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。)、

(2) 置換基を有することのある  $\alpha\text{-D-グルコピラノシルー}(1 \rightarrow 6) - \{\alpha\text{-D-グルコピラノシルー}(1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-グルコピラノシルー}(1 \rightarrow 6) -\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である  
10   場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。)  
  )、

(3) 置換基を有することのある  $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシルー}(1 \rightarrow 6) -\}_n \beta\text{-D-ガラクトピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  乃至  $R_{12}$  における 2 個以上が当該基である場合、そ  
15   れぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。)、

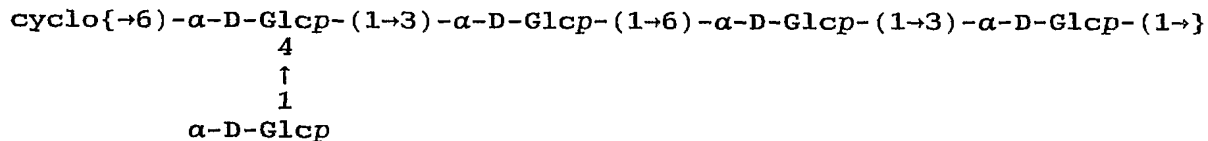
(4) 置換基を有することのある  $\alpha\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ 、  
及び

(5) 置換基を有することのある  $\beta\text{-D-キトサミニル基}$ 。

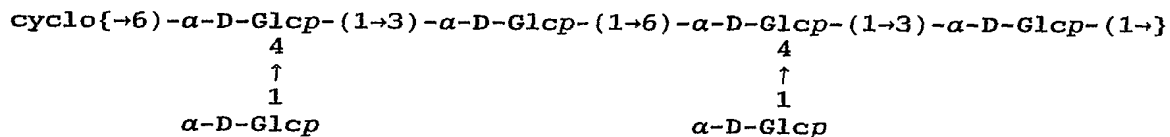
3. 一般式 1 における  $R_1$  及び／又は  $R_7$  が、置換基を有することのある  $\{\alpha\text{-D-グルコピラノシルー}(1 \rightarrow 4) -\}_n \alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_1$  及び  $R_7$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。) である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の分岐環状四糖。  
20   。

25   4. 化学式 1 又は化学式 2 で表される請求の範囲第 3 項に記載の分岐環状四糖。

化学式1:



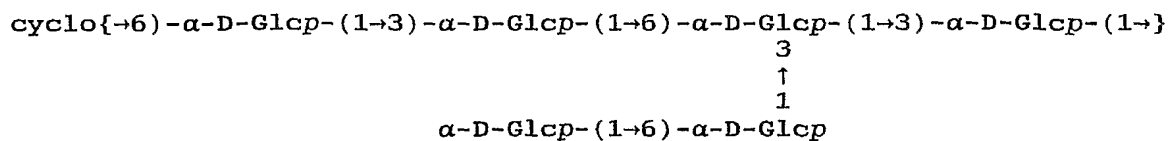
化学式2:



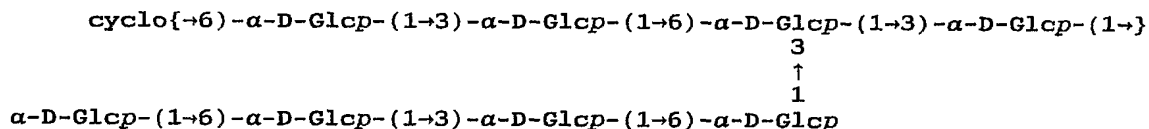
5. 一般式1における $R_2$ 及び／又は $R_8$ が、置換基を有することのある $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)-{ $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)-} $\alpha$ -D-グルコピラノシル基(ただし、 $n$ は0以上の整数を意味し、 $R_2$ 及び $R_8$ の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において $n$ は互いに独立しているものとする。)である請求の範囲第1項、第2項又は第3項に記載の分岐環状四糖。

6. 化学式3、化学式4又は化学式5で表される請求の範囲第5項に記載の分岐環状四糖。

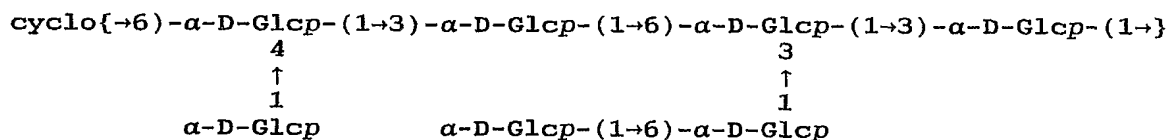
化学式3:



化学式4:



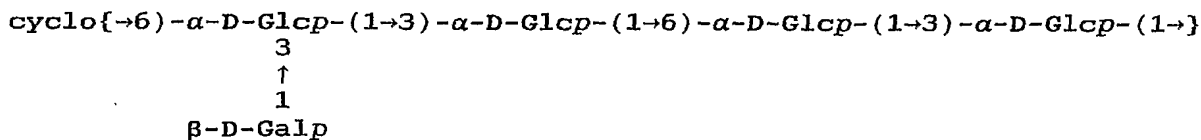
化学式5:



7. 一般式 1 における  $R_2$  及び  $\diagup$  又は  $R_8$  が、置換基を有することのある  $\{\beta-D\text{-ガラクトピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n\beta-D\text{-ガラクトピラノシル基}$ （ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_2$  及び  $R_8$  の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。）である請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載の分岐環状四糖。

8. 化学式 6 で表される請求の範囲第 7 項に記載の分岐環状四糖。

化学式6:

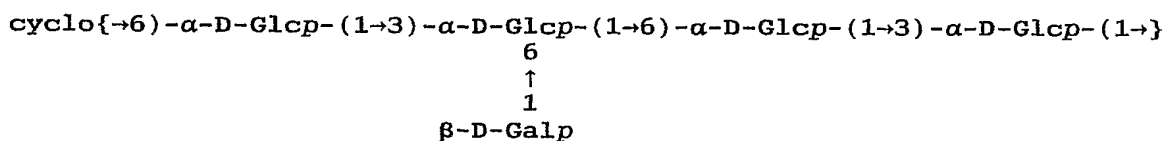


9. 一般式 1 における  $R_4$  及び／又は  $R_{10}$  が置換基を有することのある  
 $\{\beta-D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6)-\}_n \beta-D-ガラクトピ$   
 $ラノシル基$  (ただし、 $n$  は 0 以上の整数を意味し、 $R_4$  及び  $R_{10}$  の両方が

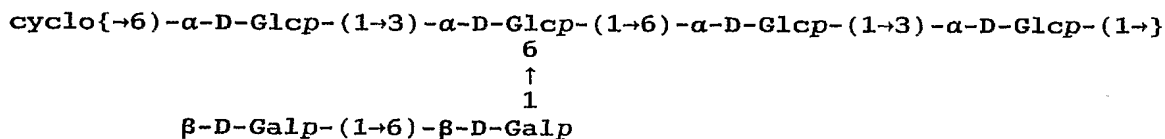
当該基である場合、それぞれの当該基において  $n$  は互いに独立しているものとする。) である請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載の分岐環状四糖。

10. 化学式7又は化学式8で表される請求の範囲第9項に記載の分  
岐環状四糖。

化学式7:



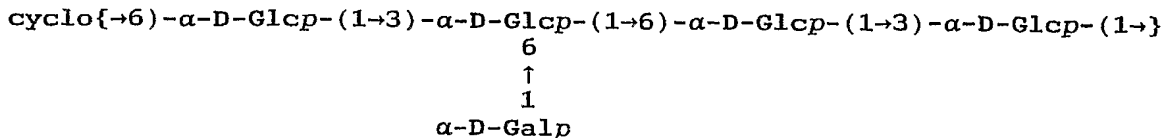
化学式8:



11. 一般式 1 における  $R_4$  及び／又は  $R_{10}$  が、置換基を有することのある  $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル基である請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載の分岐環状四糖。

12. 化学式9で表される請求の範囲第11項に記載の分岐環状四糖。

化学式9:

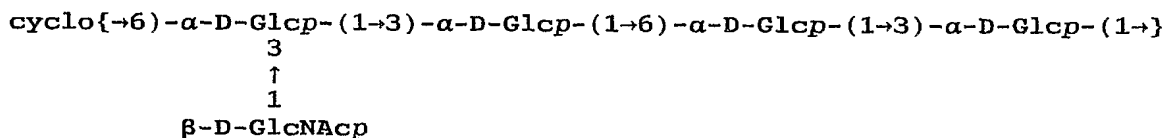


13. 一般式 1 における  $R_j$  及び  $\diagup$  又は  $R_8$  が、置換基を有することの

ある  $\beta$ -D-キトサミニル基である請求の範囲第1項、第2項又は第3項に記載の分岐環状四糖。

14. 化学式10で表される請求の範囲第13項に記載の分岐環状四糖。

化学式10:



5

15. 溶液、非晶質粉末又は含蜜結晶の状態にある請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖。

16. 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖の単離された結晶。

10 17. 化学式1、化学式2、化学式3、化学式6又は化学式7で表される分岐環状四糖の結晶である請求の範囲第16項に記載の単離された結晶。

18. 含水結晶又は無水結晶である請求の範囲第16項又は第17項に記載の単離された結晶。

15 19. 粉末X線回折法において、主たる回折角 ( $2\theta$ ) として、下記(1)乃至(5)のいずれかに示す回折角を示す請求の範囲第16項、第17項又は第18項に記載の単離された結晶:

(1) 8.  $1^\circ$ 、12.  $2^\circ$ 、14.  $2^\circ$  及び15.  $4^\circ$ 、

(2) 5.  $6^\circ$ 、8.  $8^\circ$ 、16.  $9^\circ$  及び21.  $9^\circ$ 、

20 (3) 7.  $9^\circ$ 、12.  $1^\circ$ 、17.  $9^\circ$  及び20.  $2^\circ$ 、

(4) 11.  $0^\circ$ 、12.  $3^\circ$ 、12.  $8^\circ$  及び24.  $9^\circ$ 、及び

(5) 8.  $7^\circ$ 、13.  $0^\circ$ 、21.  $7^\circ$  及び26.  $1^\circ$ 。

20. 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖と該分岐環状四糖以外の糖質とを含んでなる糖組成物。

21. 溶液、非晶質粉末、含蜜結晶又は結晶質粉末の状態にある請求の範囲第20項に記載の糖組成物。

5 22. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow$ ) で表される環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用する分岐環状四糖の製造方法であって、以下の二工程を含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法：

(1) 該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖を生成させる工程、及び

(2) 工程(1)で生成した分岐環状四糖を採取する工程。

15 23. 請求の範囲第22項に記載の分岐環状四糖の製造方法であって、工程(1)に先だって実施する、環状四糖を製造するための以下の工程をさらに含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法：

非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質に、下記(A)の酵素活性を有する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び下記(B)の酵素活性を有する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて該環状四糖を生成させ、これを採取する工程：

(A) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が $n$  ( $n$ は2以上の整数を表す。)の糖質に作用して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式と

して $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が $n+1$ である糖質を生成する、

(B) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1$ , 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を  
5 有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用して、サイクロ { $\rightarrow 6$  }  
-  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-  
- ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グル  
コピラノシル- ( $1 \rightarrow$ ) で表される環状四糖を生成する。

24. 環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転  
10 移能を有する酵素として、シクロマルトデキストリングルカノトランス  
フェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、リゾチー  
ム、下記(A)に示す酵素活性を有する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質  
生成酵素、及び下記(B)に示す酵素活性を有する $\alpha$ -イソマルトシル  
転移酵素から選ばれる1種又は2種以上を用いる請求の範囲第22項又  
15 は第23項に記載の分岐環状四糖の製造方法：

(A) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有  
するグルコース重合度が $n$  ( $n$ は2以上の整数を表す。)の糖質に作用  
して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式と  
して $\alpha-1$ , 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式と  
20 して $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が $n+1$ であ  
る糖質を生成する、

(B) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1$ , 6 グルコシル結合を有  
し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1$ , 4 グルコシル結合を  
有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用して、サイクロ { $\rightarrow 6$  }  
25 -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-  
- ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グル

コピラノシルー（1→} で表される環状四糖を生成する。

25. 単糖、オリゴ糖又は多糖として、グルコース1ーリン酸、マルトオリゴ糖、環状デキストリン、パノース、イソマルトシルグルコ糖質、ラクトース、メリビオース、Nーアセチルキトオリゴ糖、デキストリン、グリコーゲン、液化澱粉、及びキチンから選ばれる1種又は2種以上を用いる請求の範囲第22項、第23項又は第24項に記載の分岐環状四糖の製造方法。

26. 生成させた分岐環状四糖を、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィー及び結晶化から選ばれる1種又は2種以上の精製方法を含む工程により採取する請求の範囲第22項乃至第25項のいずれかに記載の分岐環状四糖の製造方法。

27. サイクロ{→6}ー $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（1→3）ー $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（1→6）ー $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（1→3）ー $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（1→} で表される環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用するグリコシル基の転移方法であって、該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖を生成させる工程を含むことを特徴とする環状四糖へのグリコシル基の転移方法。

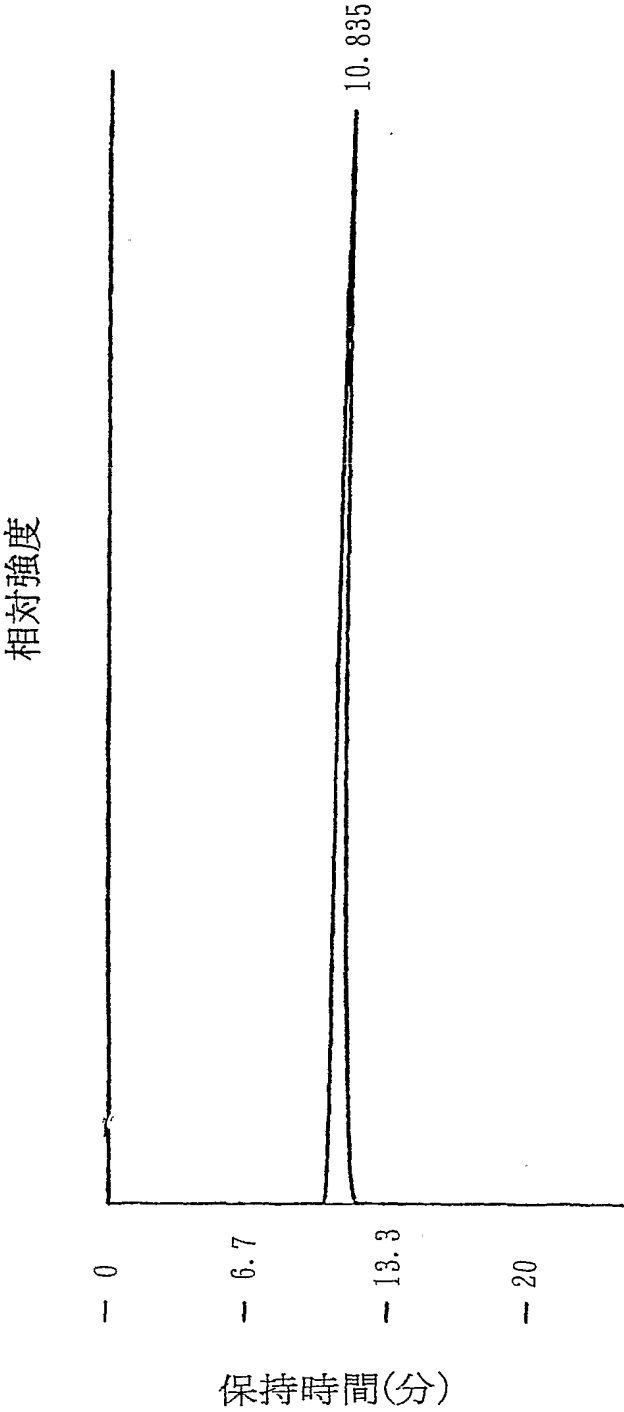
28. 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖を含んでなる組成物。

29. 飲食物、化粧品又は医薬品としての請求の範囲第28項に記載の組成物。



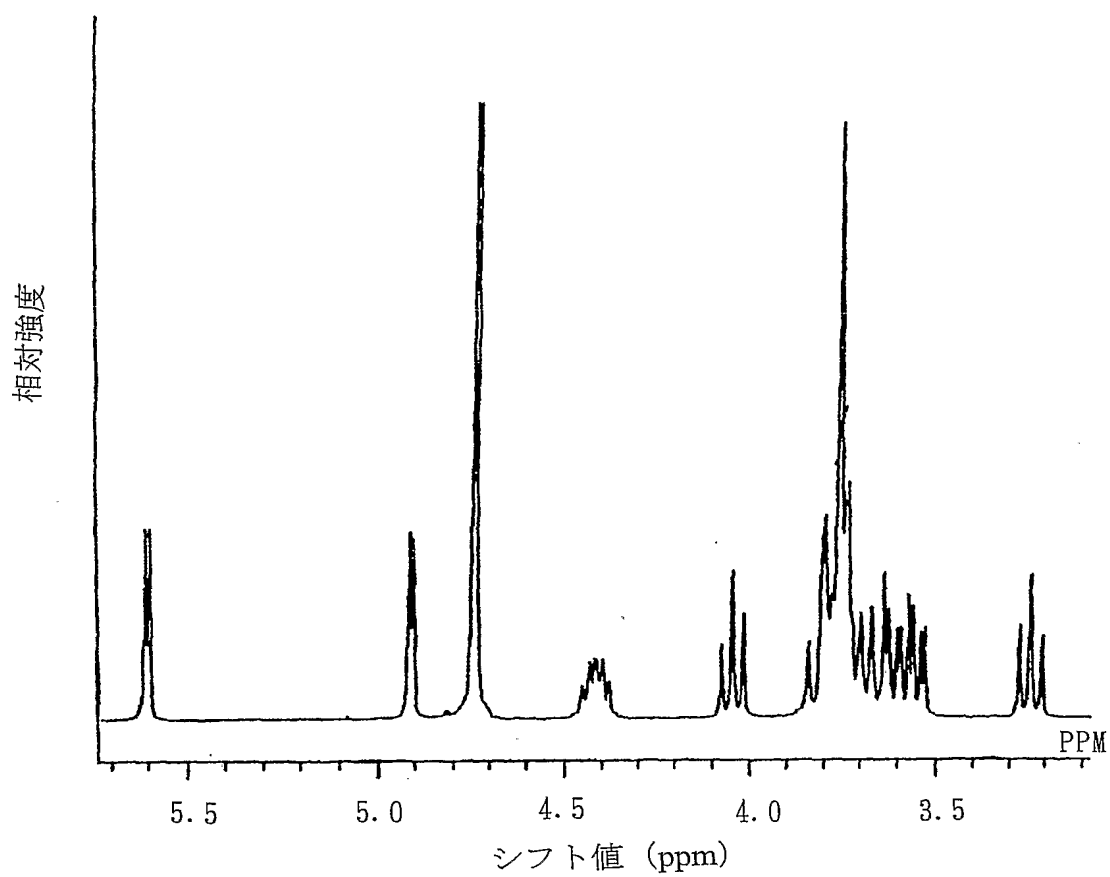
1/20

第 1 図



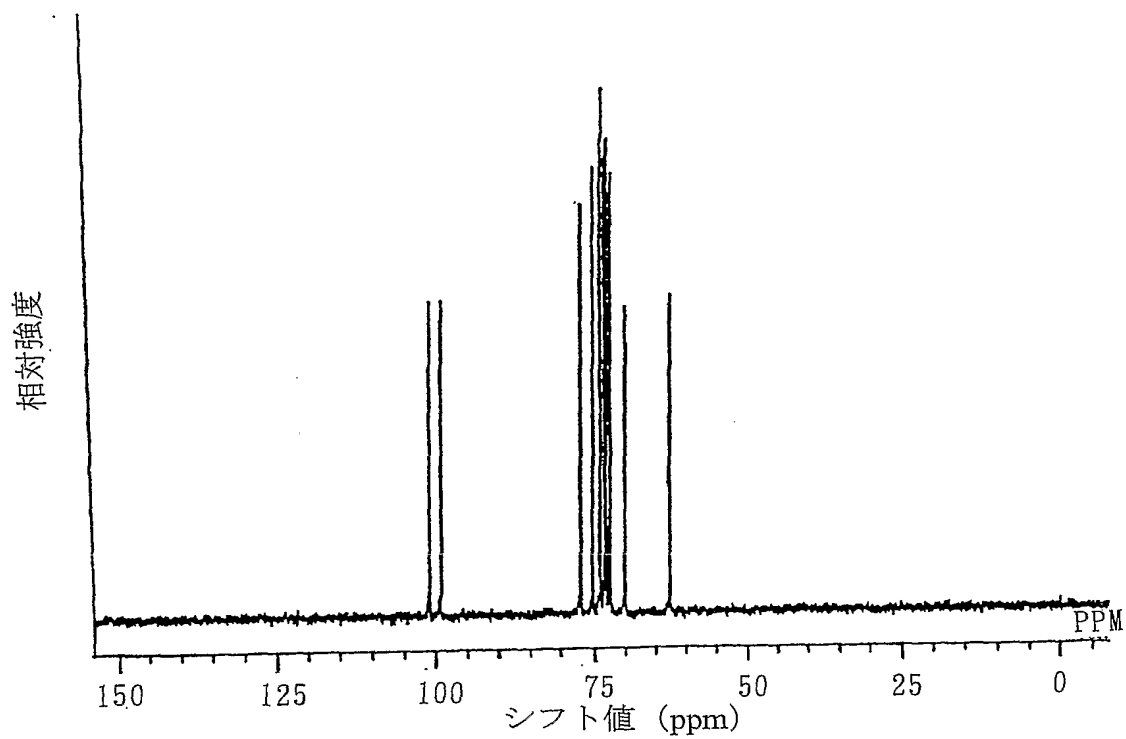
2/20

第 2 図

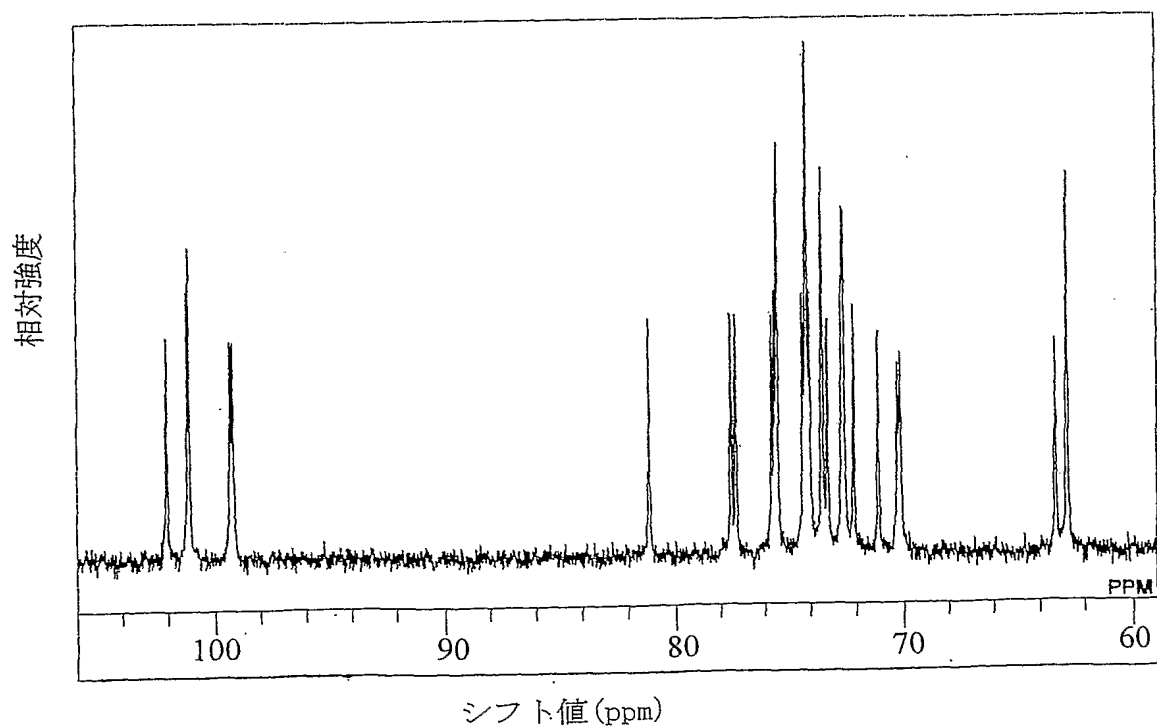


3/20

第3図

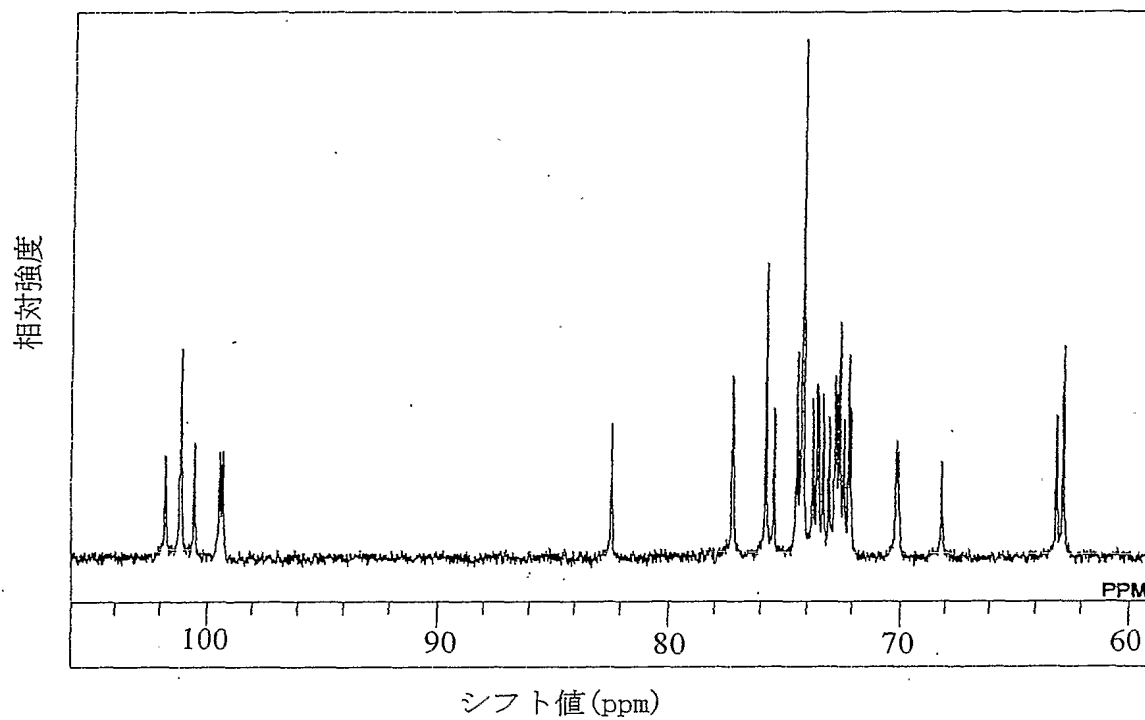


第4図

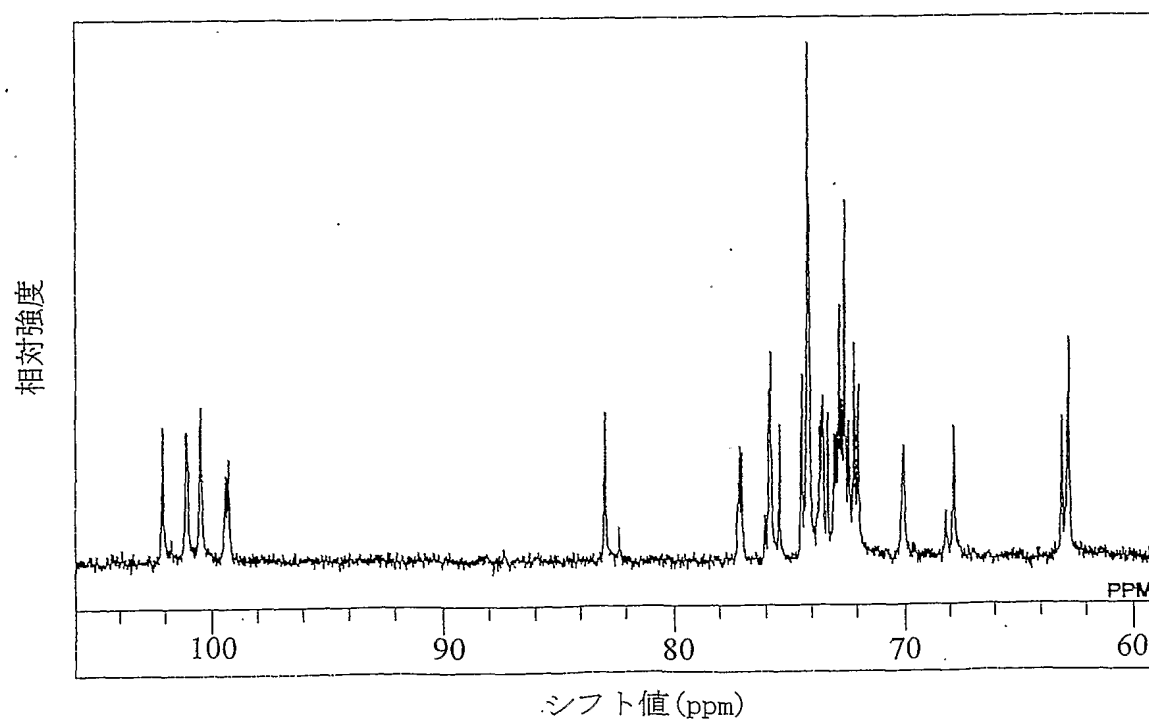


4/20

第 5 図

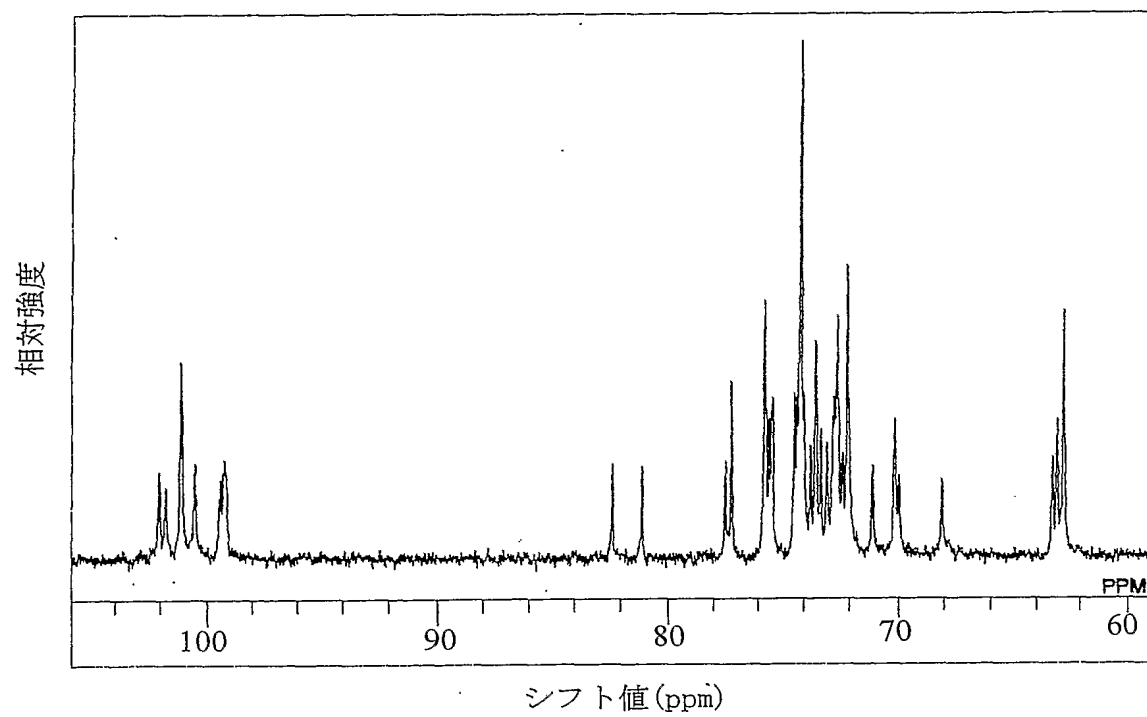


第 6 図



5/20

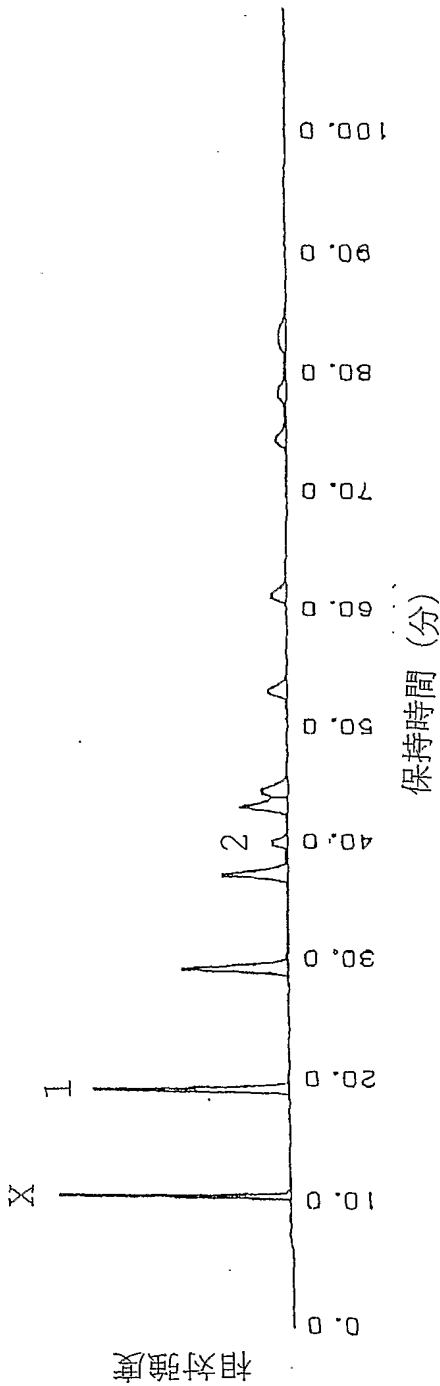
第 7 図



6/20

第 8 a 図

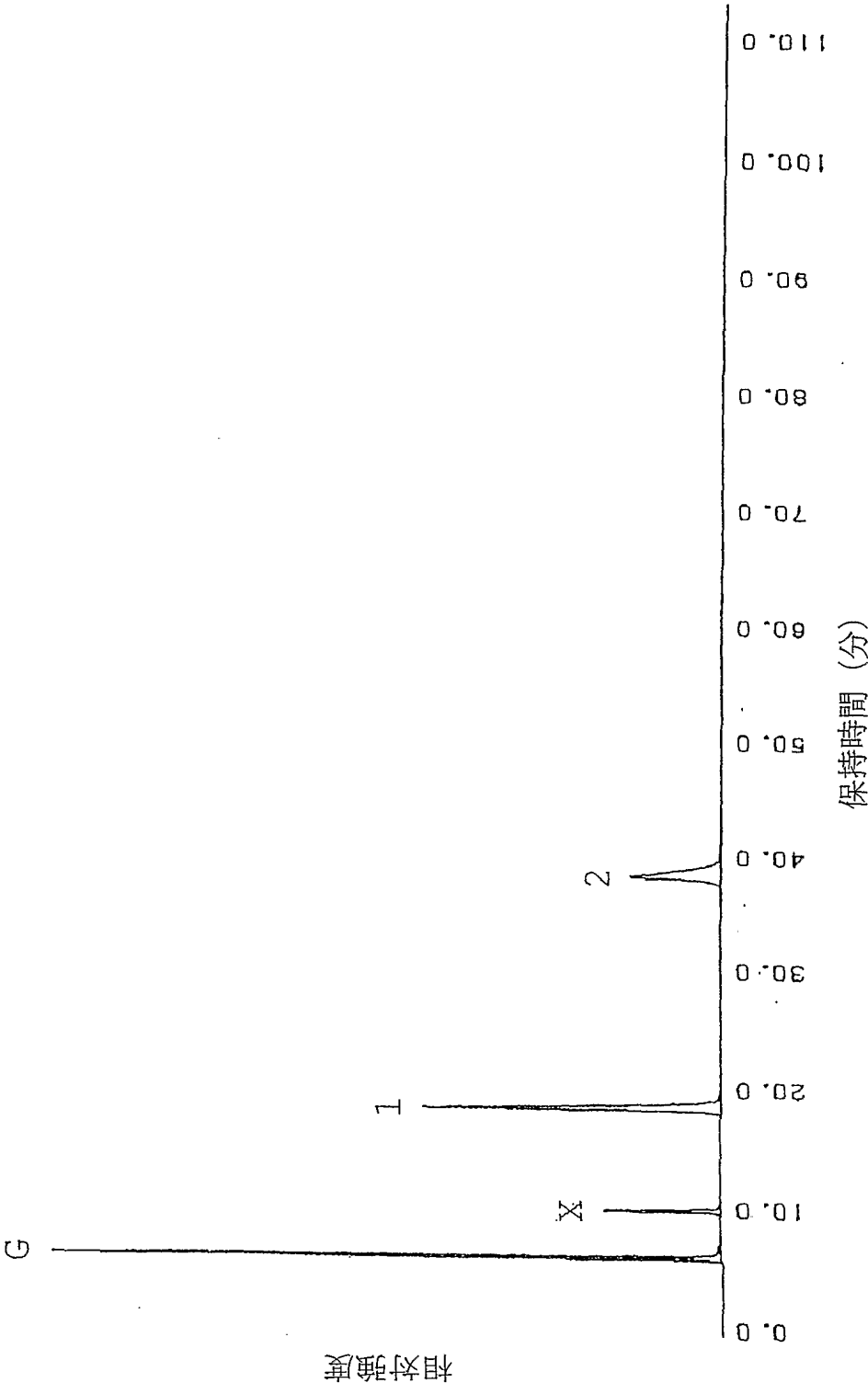
(a)



7/20

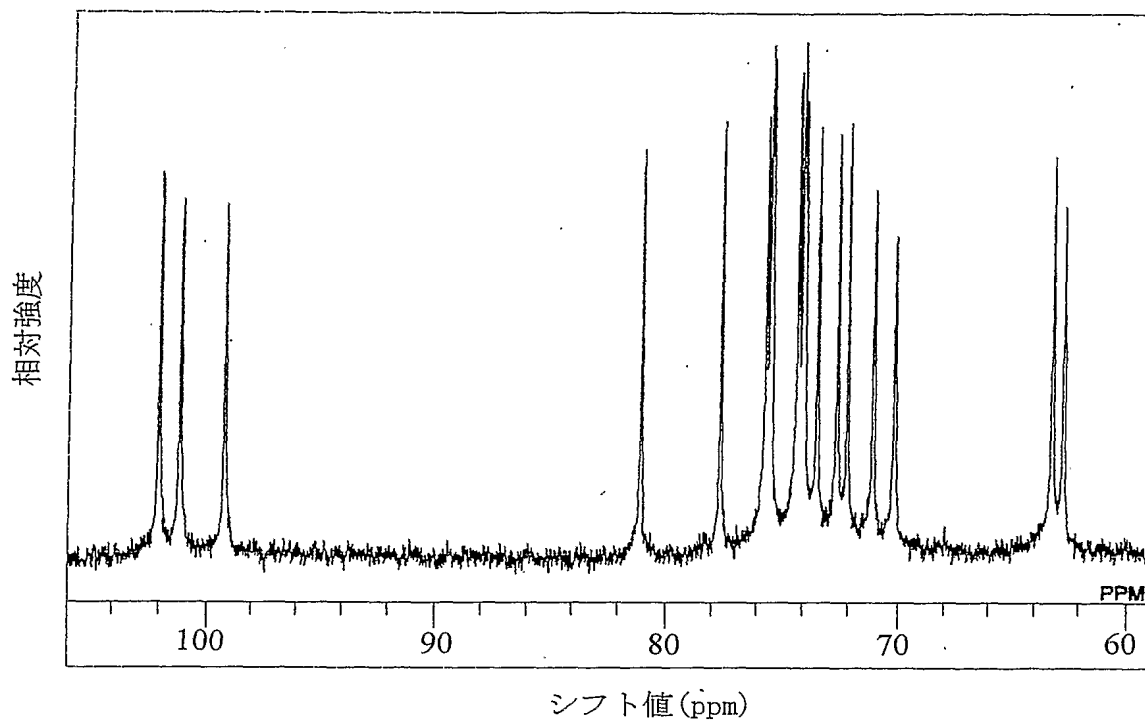
第 8 b 図

(b)

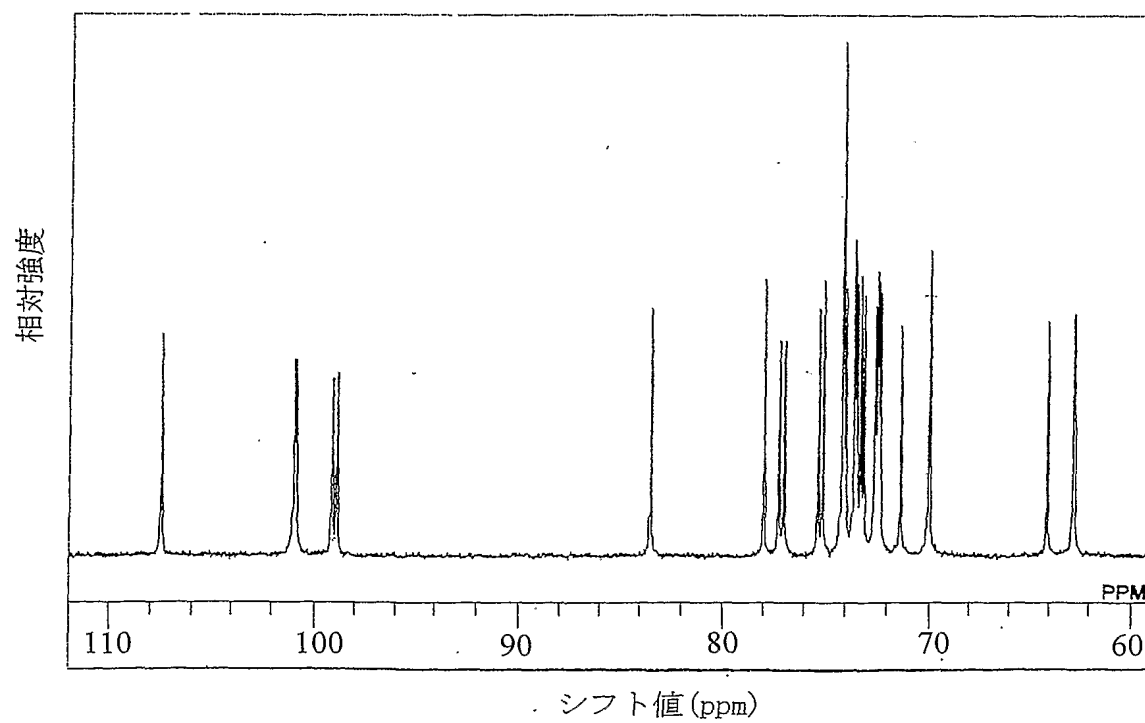


8/20

第 9 図



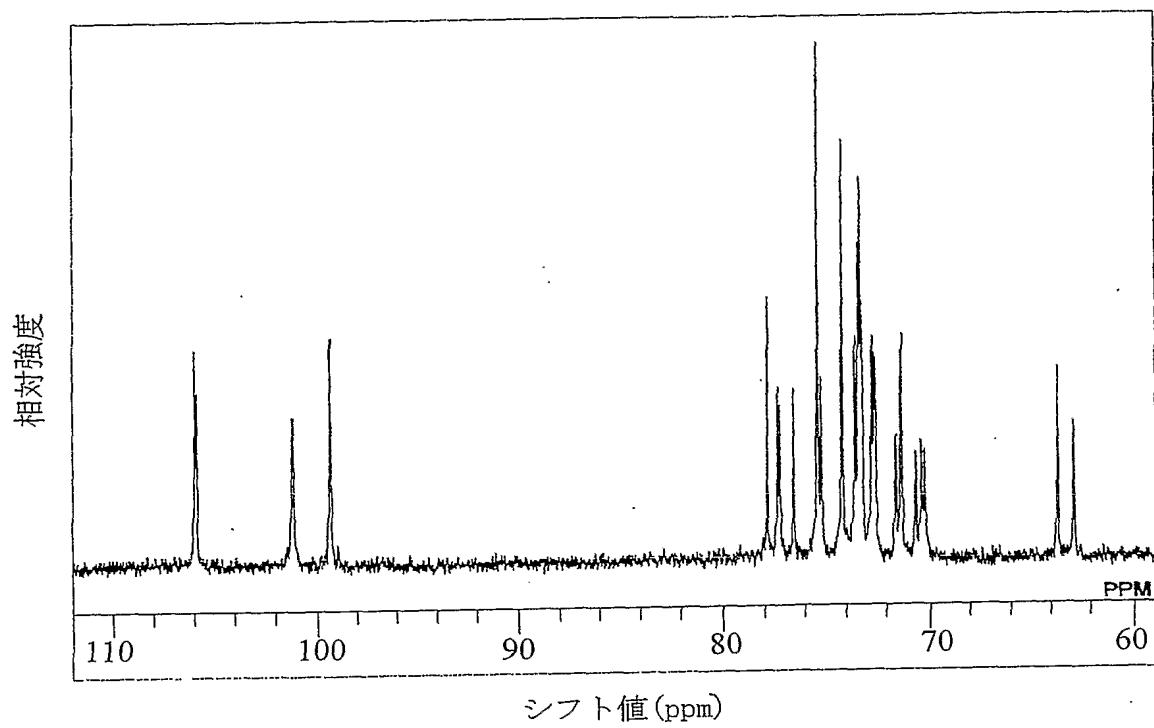
第 10 図



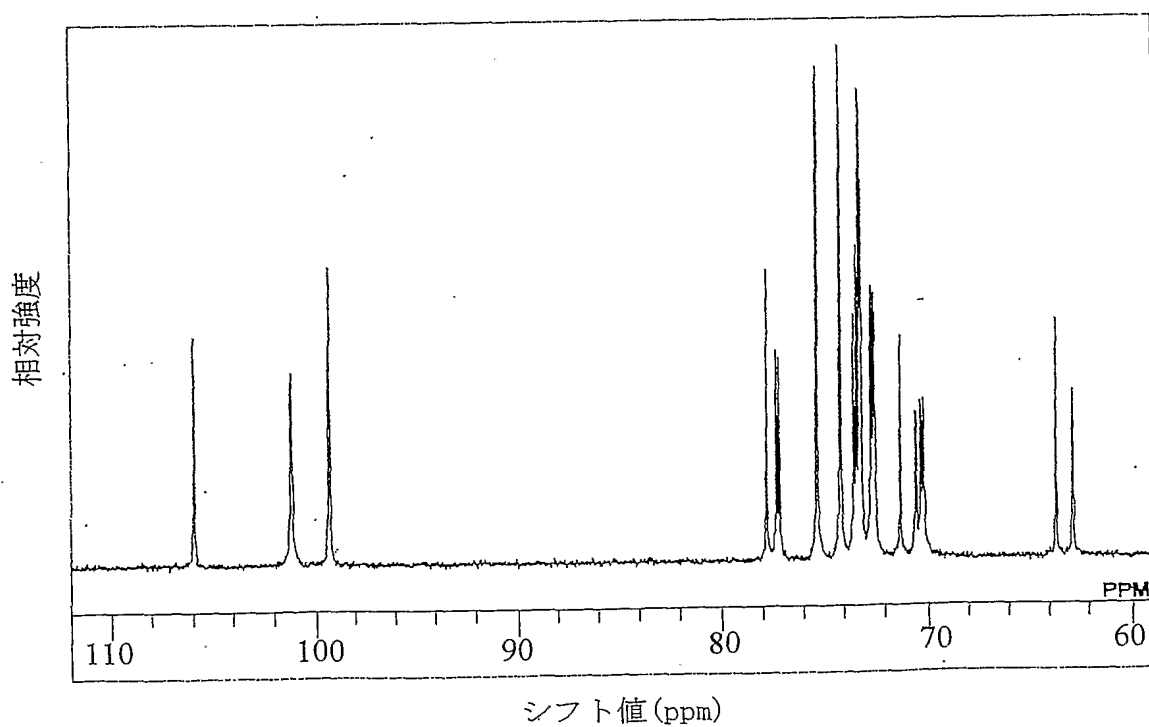


9/20

第 1 1 図

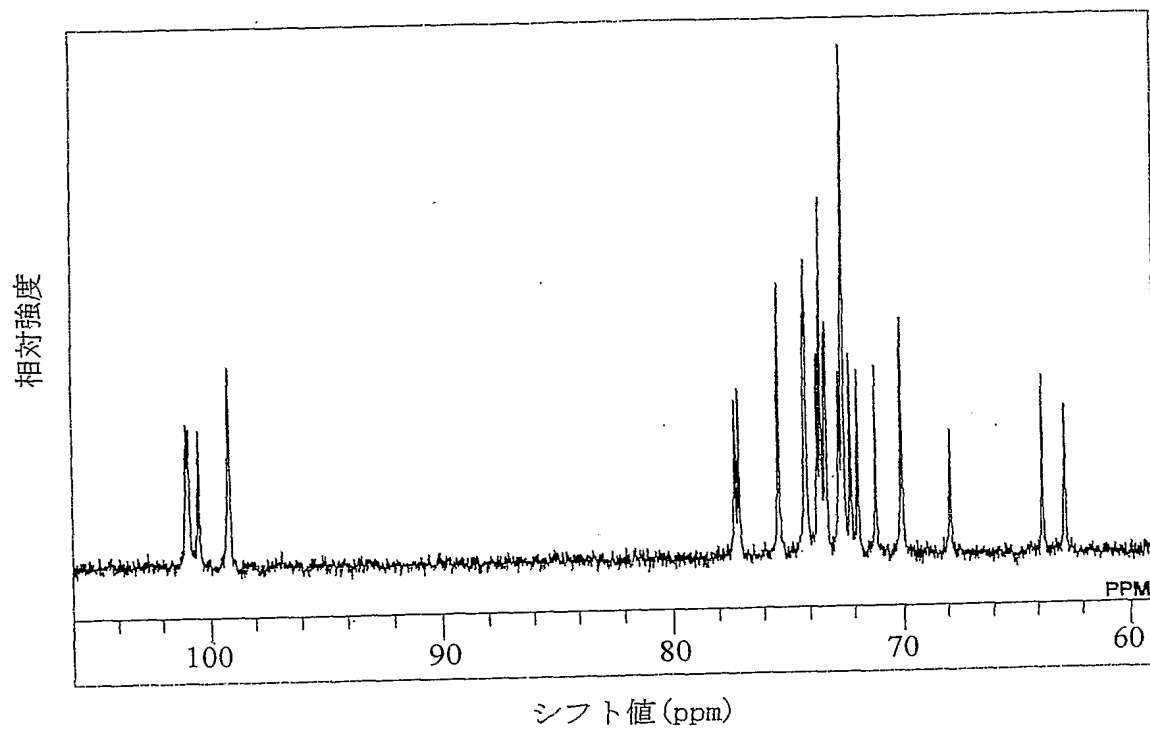


第 1 2 図

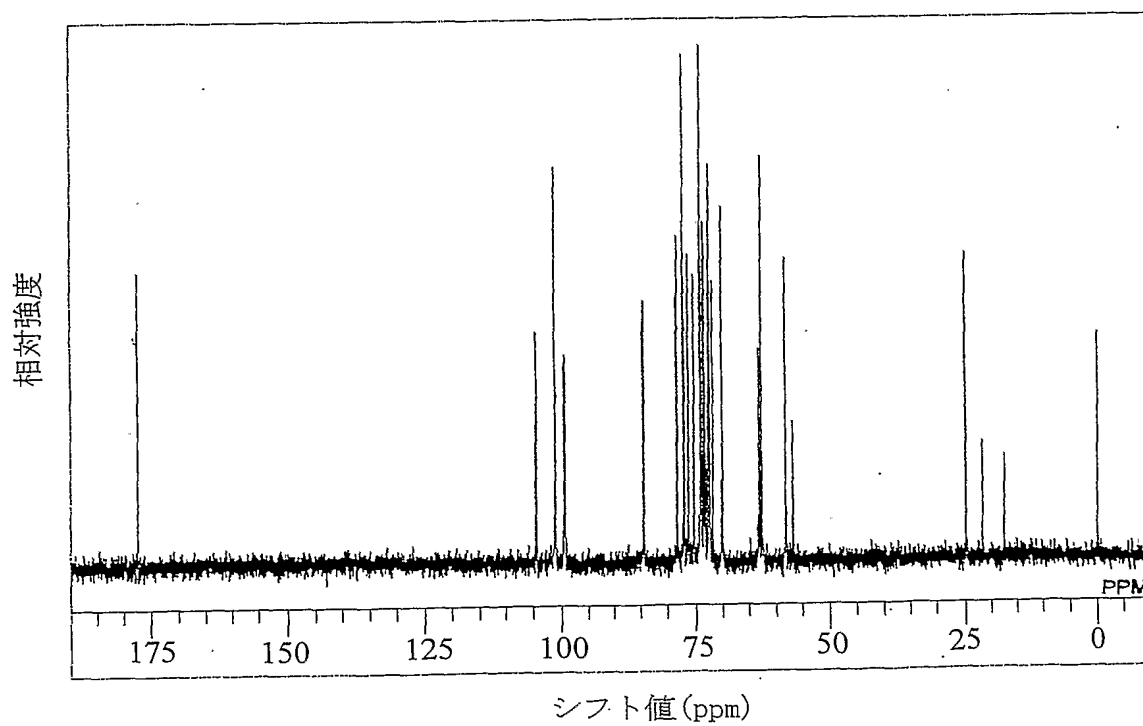


10/20

第 1 3 図

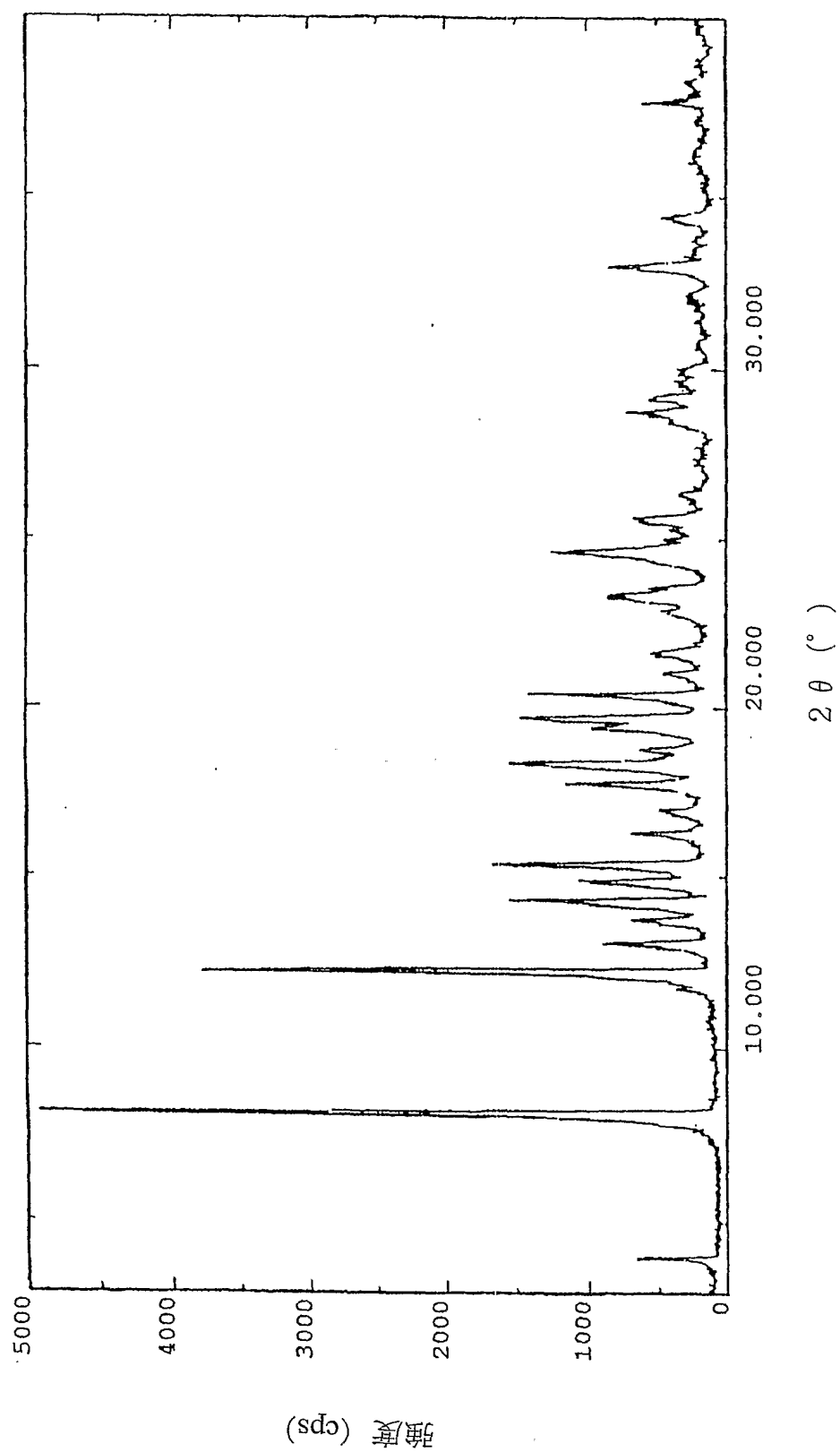


第 1 4 図



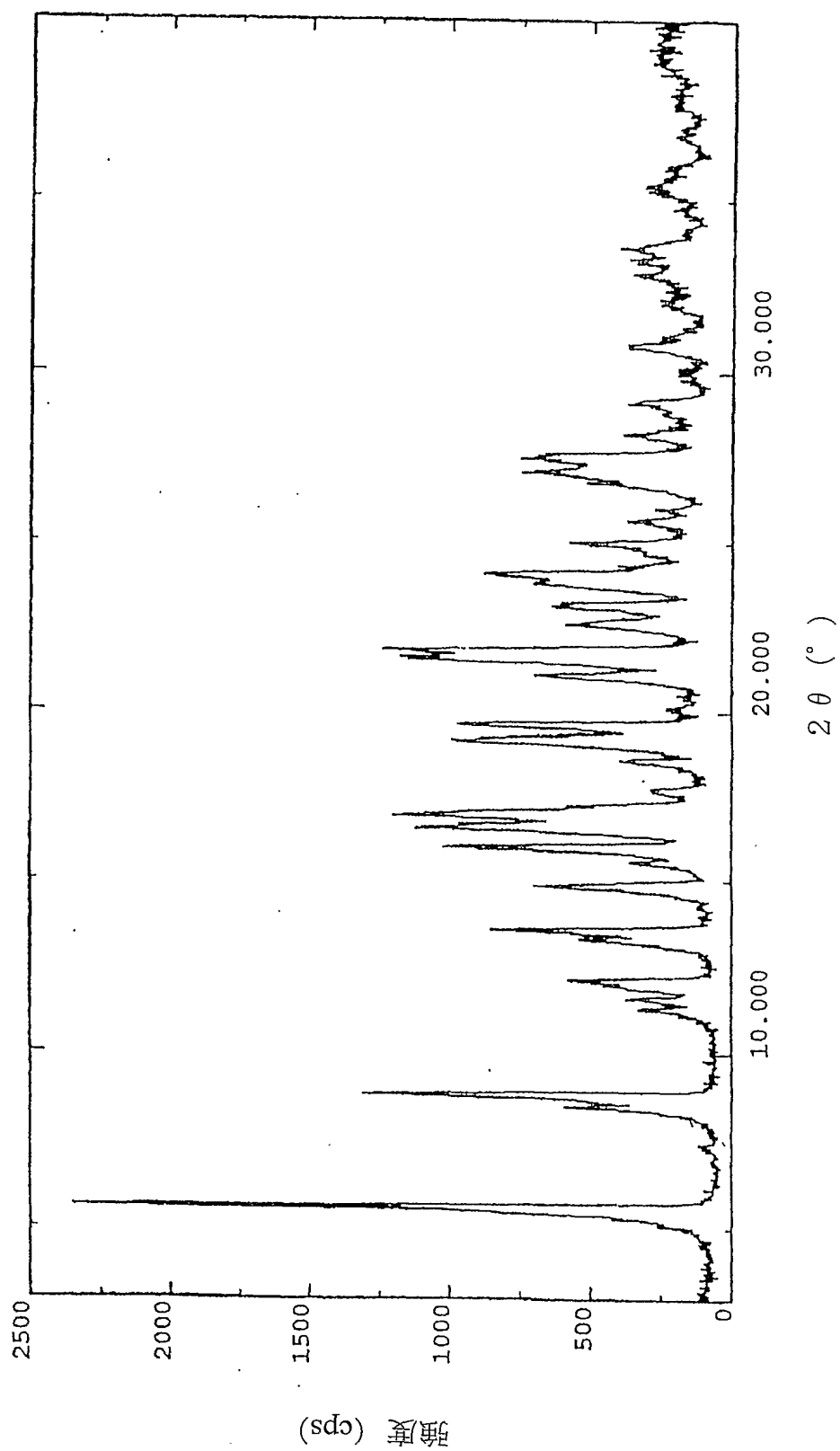
11/20

第 1 5 図



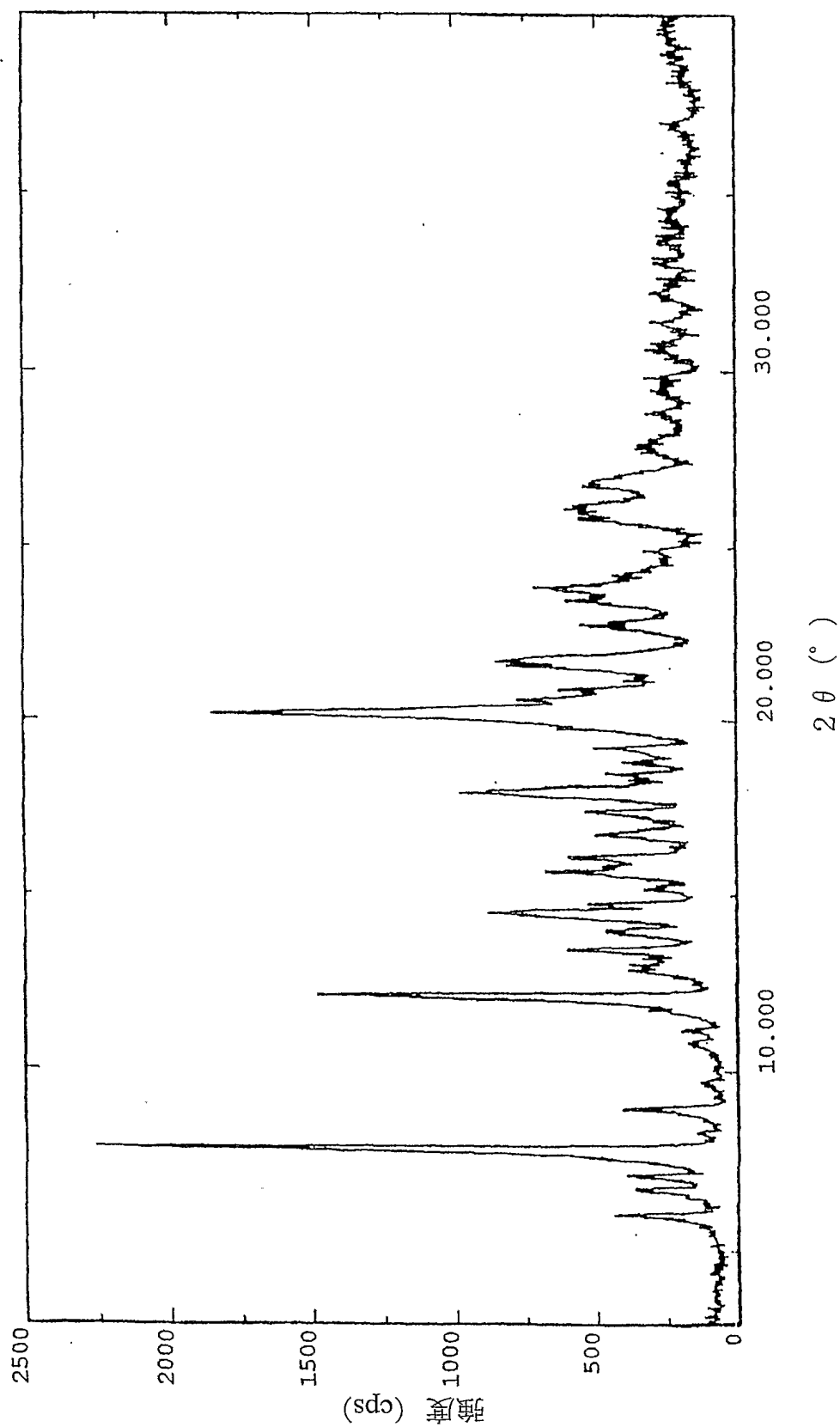
12/20

第 1 6 図



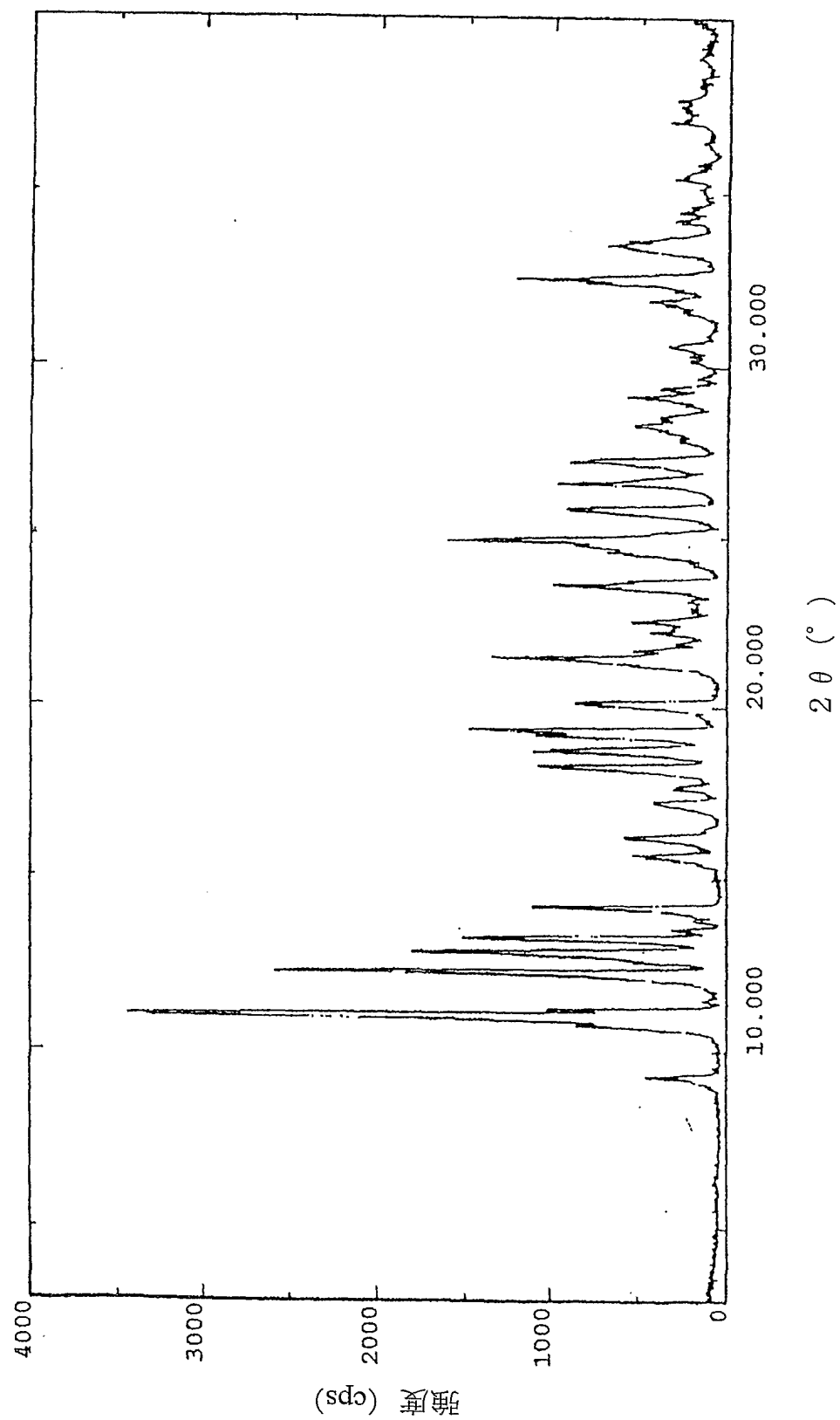
13/20

第 17 図



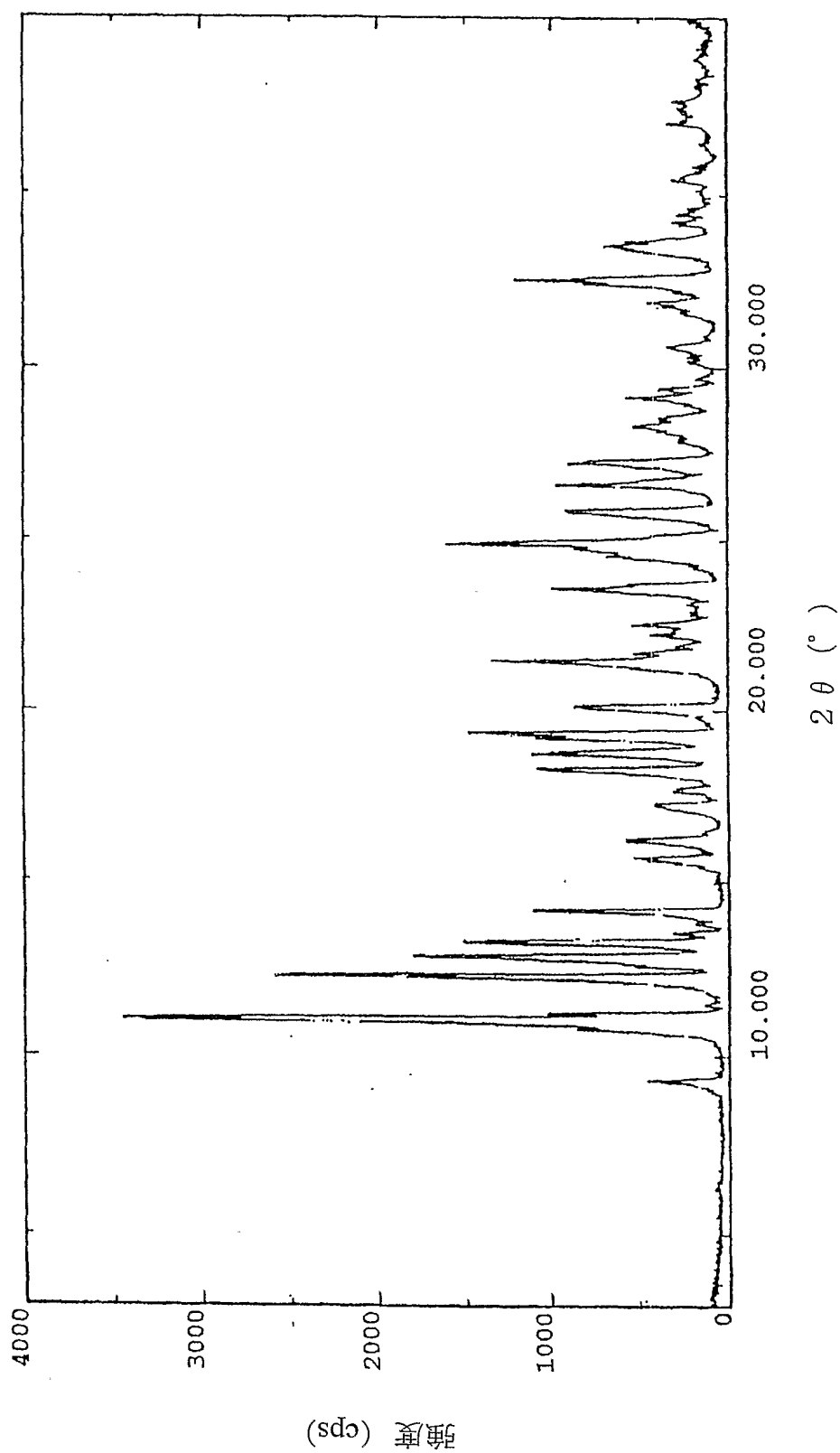
14/20

第 1 8 図

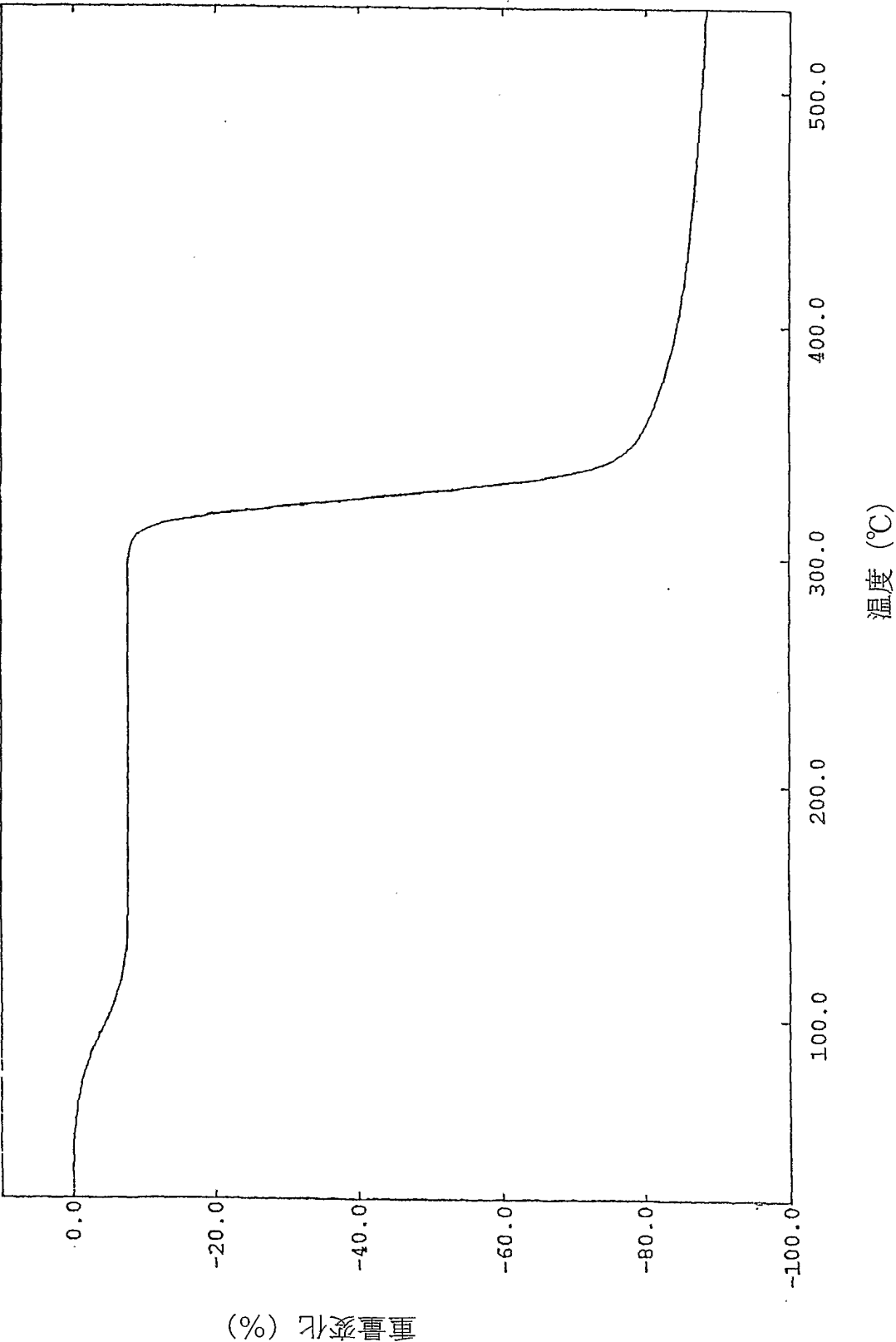


15/20

第 1 9 図

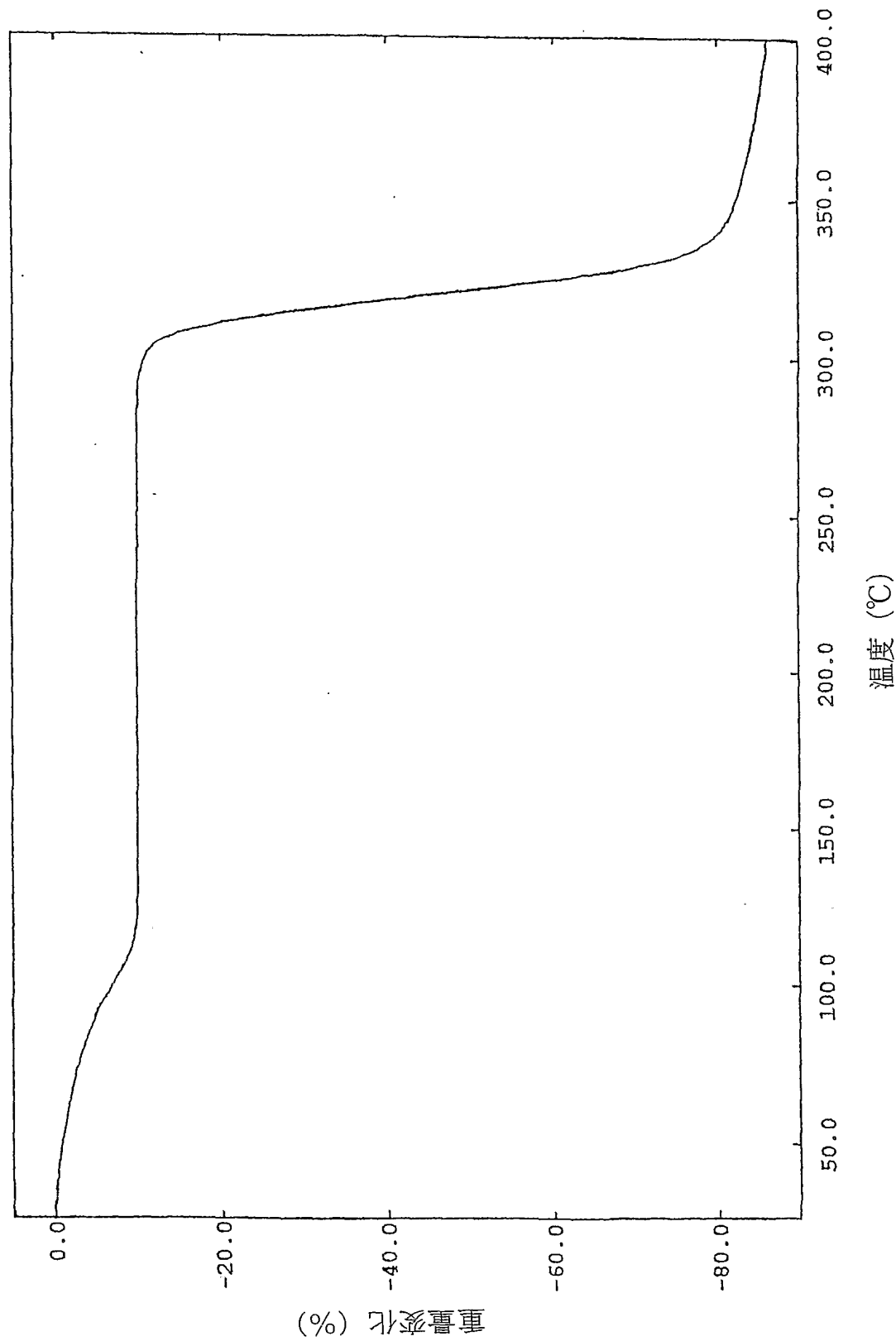


16/20  
第 2 0 図

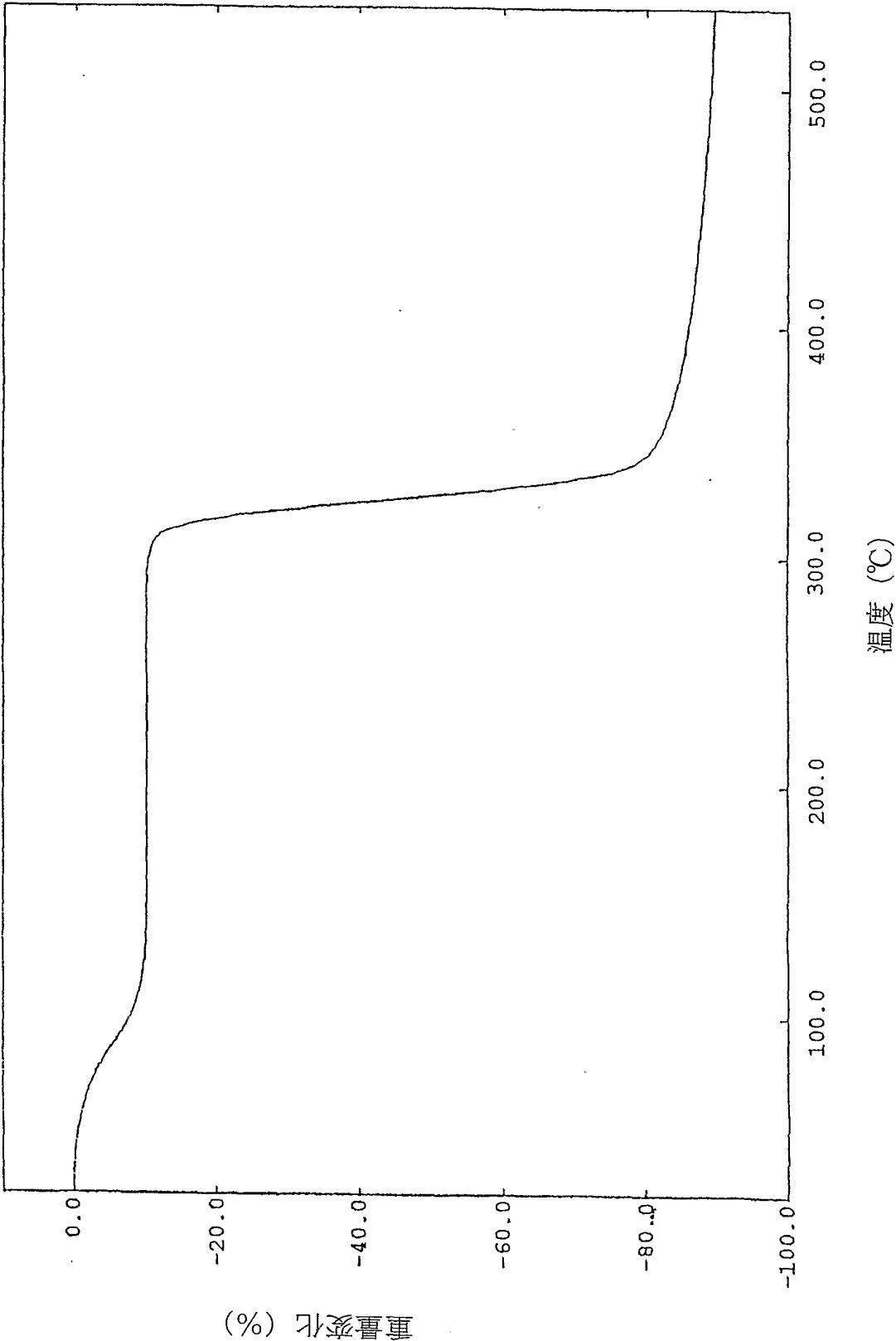




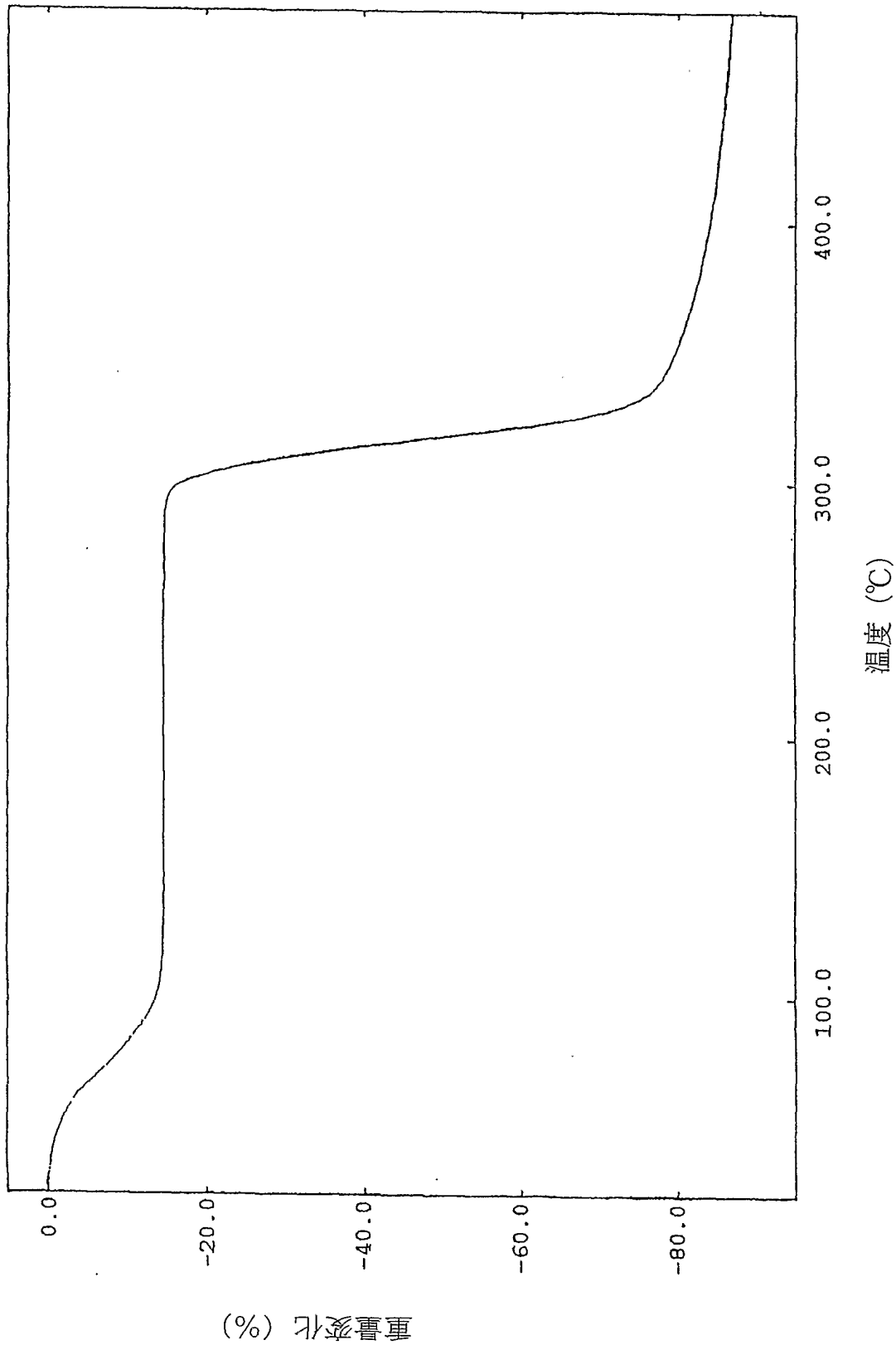
17/20  
第 2 1 図



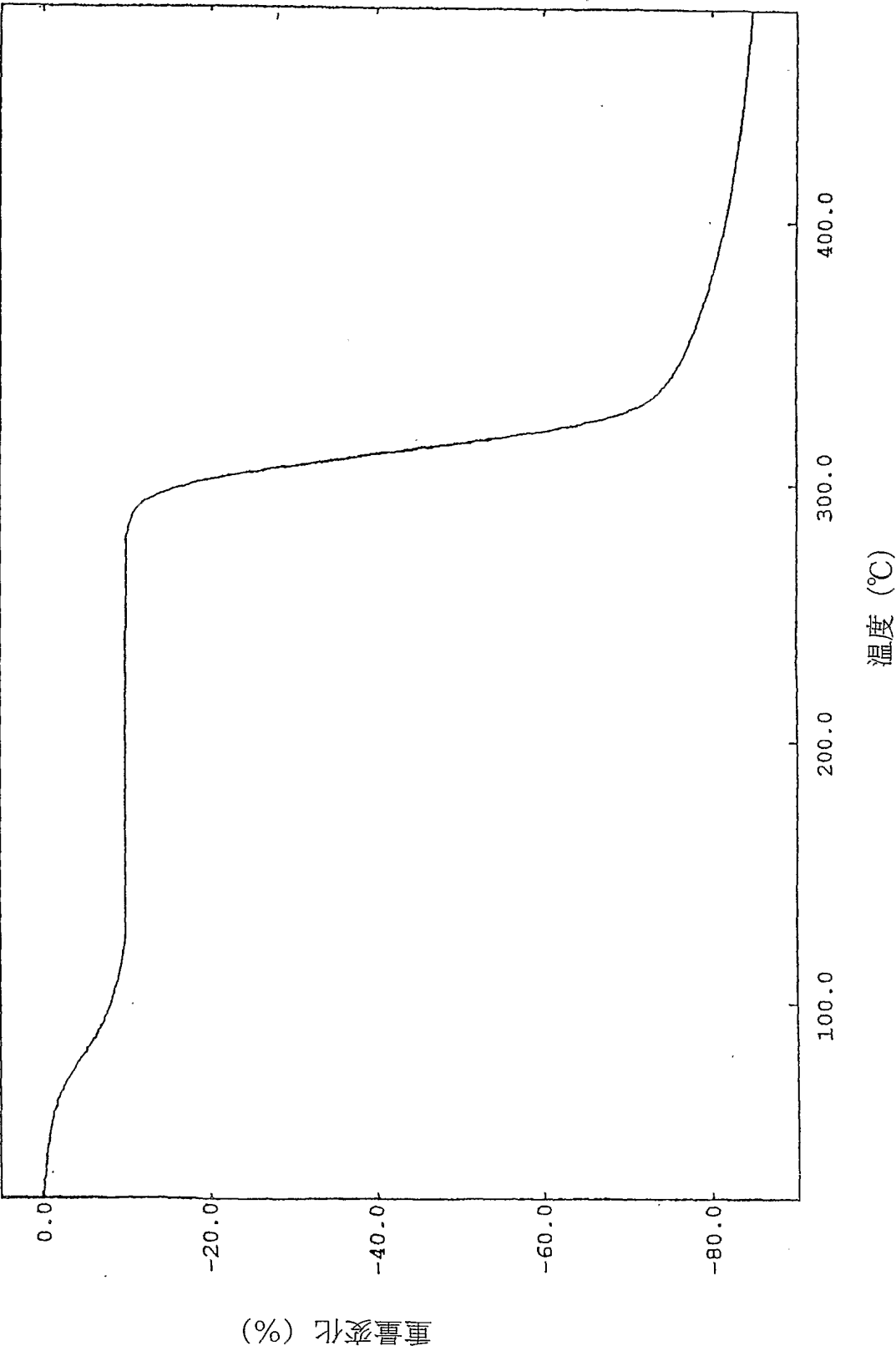
18/20  
第 2 2 図



19/20  
第 2 3 図



20/20  
第 2 4 図



## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Branched cyclic-tetrasaccharides, their preparations and uses

<130> 2

&lt;160&gt; W0889

 $\langle 210 \rangle$  1

<211> 3282

&lt;212&gt; DNA

〈213〉 *Bacillus globisporus*

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> CDS

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (3282)$  $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; sig\_peptide

 $\langle 222 \rangle$  (1) ... (87)

$\langle 400 \rangle$  1

atg	tat	gta	agg	aat	cta	aca	ggt	tca	ttc	cga	ttt	tct	ctc	tct	ttt	48
Met	Tyr	Val	Arg	Asn	Leu	Thr	Gly	Ser	Phe	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Phe	
1			5				10				15					
ttg	ctc	tgt	ttc	tgt	ctc	ttc	gtc	ccc	tct	att	tat	gcc	att	gat	ggt	96
Leu	Leu	Cys	Phe	Cys	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Ile	Tyr	Ala	Ile	Asp	Gly	
			20				25				30					
gtt	tat	cat	gcg	cca	tac	gga	atc	gat	gat	cig	tac	gag	att	cag	gcg	144
Val	Tyr	His	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp	Asp	Leu	Tyr	Glu	Ile	Gln	Ala	
		35				40				45						
acg	gag	cgg	agt	cca	aga	gat	ccc	glt	gca	ggc	gat	act	gtg	tat	atc	192
Thr	Glu	Arg	Ser	Pro	Arg	Asp	Pro	Val	Ala	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Ile	
	50					55				60						

2/14

aag	ata	aca	acg	tgg	ccc	att	gaa	tca	gga	caa	acg	gct	tgg	gtg	acc	240
Lys	Ile	Thr	Thr	Trp	Pro	Ile	Glu	Ser	Gly	Gln	Thr	Ala	Trp	Val	Thr	
65					70				75						80	
tgg	acg	aaa	aac	ggg	gtc	aat	caa	gct	gct	gtc	gga	gca	gca	ttc	aaa	288
Trp	Thr	Lys	Asn	Gly	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Phe	Lys	
				85				90						95		
tac	aac	agc	ggc	aac	aac	act	tac	tgg	gaa	gcg	aac	ctt	ggc	act	ttt	336
Tyr	Asn	Ser	Gly	Asn	Asn	Thr	Tyr	Trp	Glu	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Phe	
			100					105					110			
gca	aaa	ggg	gac	gtg	atc	agt	tat	acc	ggt	cat	ggc	aac	aag	gat	ggc	384
Ala	Lys	Gly	Asp	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr	Val	His	Gly	Asn	Lys	Asp	Gly	
		115					120				125					
gcg	aat	gag	aag	gtt	atc	ggg	cct	ttt	act	ttt	acc	gtt	acg	gga	tgg	432
Ala	Asn	Glu	Lys	Val	Ile	Gly	Pro	Phe	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Gly	Trp	
		130				135				140						
gaa	tcc	gtt	agc	agt	atc	agc	tct	att	acg	gat	aat	acg	aac	cgt	gtt	480
Glu	Ser	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ile	Thr	Asp	Asn	Thr	Asn	Arg	Val	
145				150					155					160		
gtg	ctg	aat	gcg	gtg	ccg	aat	aca	ggc	aca	tig	aag	cca	aag	atc	aac	528
Val	Leu	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Thr	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Lys	Ile	Asn	
			165					170					175			
ctt	tcc	ttt	acg	gcg	gat	gat	gtc	ctc	cgc	gta	cag	gtt	tct	cca	acc	576
Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Val	Gln	Val	Ser	Pro	Thr	
		180						185				190				
gga	aca	gga	acg	tta	agc	agt	gga	ctt	agt	aat	tac	aca	gtt	tca	gat	624
Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Thr	Val	Ser	Asp	
		195					200				205					
acc	gcc	tca	acc	act	tgg	ctt	aca	act	tcc	aag	ctg	aag	gtg	aag	gtg	672
Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Trp	Leu	Thr	Thr	Ser	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Val	
	210					215				220						
gat	aag	aat	cca	ttc	aaa	ctt	agt	gtg	tat	aag	cct	gat	gga	acg	acg	720
Asp	Lys	Asn	Pro	Phe	Lys	Leu	Ser	Val	Tyr	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Thr	
225				230					235					240		
tig	att	gcc	cgt	caa	tat	gac	agc	act	acg	aat	cgt	aac	att	gcc	tgg	768
Leu	Ile	Ala	Arg	Gln	Tyr	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Arg	Asn	Ile	Ala	Trp	
		245						250					255			

3/14

tta acc aat ggc agt aca atc atc gac aag gta gaa gat cat ttt tat	816
Leu Thr Asn Gly Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Glu Asp His Phe Tyr	
260 265 270	
tca ccg gct tcc gag gag ttt ttt ggc ttt gga gag cat tac aac aac	864
Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu His Tyr Asn Asn	
275 280 285	
ttc cgt aaa cgc gga aat gat gig gac acc tat gtg ttc aac cag tat	912
Phe Arg Lys Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe Asn Gln Tyr	
290 295 300	
aag aat caa aat gac cgc acc tac atg gca att cct ttt atg ctt aac	960
Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe Met Leu Asn	
305 310 315 320	
agc agc ggt tat ggc att ttc gta aat tca acg tat tat tcc aaa ttt	1008
Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Lys Phe	
325 330 335	
cgg ttg gca acc gaa cgc acc gat atg ttc agc ttt acg gct gat aca	1056
Arg Leu Ala Thr Glu Arg Thr Asp Met Phe Ser Phe Thr Ala Asp Thr	
340 345 350	
ggg ggt agt gcc gcc tcg atg ctg gat tat tat ttc att tac ggt aat	1104
Gly Gly Ser Ala Ala Ser Met Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile Tyr Gly Asn	
355 360 365	
gat ttg aaa aat gig gtg agt aac tac gct aac att acc ggt aag cca	1152
Asp Leu Lys Asn Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr Gly Lys Pro	
370 375 380	
aca gcg ctg ccg aaa tgg gct ttc ggg tta tgg atg tca gct aac gag	1200
Thr Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu	
385 390 395 400	
tgg gat cgt caa acc aag gtg aat aca gcc att aat aac gcg aac tcc	1248
Trp Asp Arg Gln Thr Lys Val Asn Thr Ala Ile Asn Asn Ala Asn Ser	
405 410 415	
aat aat att ccg gct aca gcg gtt gig ctg gaa cag tgg agt gat gag	1296
Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp Ser Asp Glu	
420 425 430	
aac acg ttt tat att ttc aat gat gcc acc tat acc ccg aaa acg ggc	1344
Asn Thr Phe Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Thr Tyr Thr Pro Lys Thr Gly	
435 440 445	

4/14

```

agt gct gcg cat gcc tat acc gat ttc act ttc ccg aca tct ggg aga 1393
Ser Ala Ala His Ala Tyr Thr Asp Phe Thr Phe Pro Thr Ser Gly Arg
    450                455                460
tgg acg gat cca aaa gcg atg gca gac aat gtg cat aac aat ggg atg 1440
Trp Thr Asp Pro Lys Ala Met Ala Asp Asn Val His Asn Asn Gly Met
    465                470                475                480
aag ctg gtg ctt tgg cag gtc cct att cag aaa tgg act tca acg ccc 1488
Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr Ser Thr Pro
                485                490                495
tat acc cag aaa gat aat gat gaa gcc tat atg acg gct cag aat tat 1536
Tyr Thr Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ala Tyr Met Thr Ala Gln Asn Tyr
                500                505                510
gca gtt ggc aac ggt agc gga ggc cag tac agg ata cct tca gga caa 1584
Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro Ser Gly Gln
                515                520                525
tgg ttc gag aac agt ttg ctg ctt gat ttt acg aat acg gcc gcc aaa 1632
Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Thr Ala Ala Lys
    530                535                540
aac tgg tgg atg tct aaa cgc gct tat ctg ttt gat ggt gtg ggt atc 1680
Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly Val Gly Ile
    545                550                555                560
gac ggc ttc aaa aca gat ggc ggt gaa atg gta tgg ggt cgc tca aat 1728
Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg Ser Asn
                565                570                575
act ttc tca aac ggt aag aaa ggc aat gaa atg cgc aat caa tac ccg 1776
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Lys Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr Pro
                580                585                590
aat gag tat gtg aaa gcc tat aac gag tac gcg cgc tcg aag aaa gcc 1824
Asn Glu Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser Lys Lys Ala
                595                600                605
gat gcg gtc tcc ttt agc cgt tcc ggc acg caa ggc gca cag gcg aat 1872
Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala Gln Ala Asn
    610                615                620
cag att ttc tgg tcc ggt gac caa gag tcg acg ttt ggt gct ttt caa 1920
Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly Ala Phe Gln
    625                630                635                640

```



5/14

caa gct gtg aat gca ggg ctt acg gca agt atg tct ggc gtt cct tat	1968
Gln Ala Val Asn Ala Gly Leu Thr Ala Ser Met Ser Gly Val Pro Tyr	
645 650 655	
tgg agc tgg gat atg gca ggc ttt aca ggc act tat cca acg gct gag	2016
Trp Ser Trp Asp Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Pro Thr Ala Glu	
660 665 670	
ttg tac aaa cgt gct act gaa atg gct gct ttt gca ccg gtc atg cag	2064
Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Glu Met Ala Ala Phe Ala Pro Val Met Gln	
675 680 685	
ttt cat tcc gag tct aac ggc agc tct ggt atc aac gag gaa cgt tct	2112
Phe His Ser Glu Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu Glu Arg Ser	
690 695 700	
cca tgg aac gca caa gcg cgt aca ggc gac aat acg atc att agt cat	2160
Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile Ile Ser His	
705 710 715 720	
ttt gcc aaa tat acg aat acg cgc atg aat ttg ctt cct tat att tat	2208
Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro Tyr Ile Tyr	
725 730 735	
agc gaa gcg aag atg gct agt gat act ggc gtt ccc atg atg cgc gcc	2256
Ser Glu Ala Lys Met Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met Met Arg Ala	
740 745 750	
atg gcg ctt gaa tat ccg aag gac acg aac acg tac ggt itg aca caa	2304
Met Ala Leu Glu Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Thr Gln	
755 760 765	
cag tat atg ttc gga ggt aat tta ctt att gct cct gtt atg aat cag	2352
Gln Tyr Met Phe Gly Gly Asn Leu Leu Ile Ala Pro Val Met Asn Gln	
770 775 780	
gga gaa aca aac aag agt att tat ctt ccg cag ggg gat tgg atc gat	2400
Gly Glu Thr Asn Lys Ser Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp Ile Asp	
785 790 795 800	
ttc tgg ttc ggt gct cag cgt cct ggc ggt cga aca atc agc tac acg	2448
Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile Ser Tyr Thr	
805 810 815	
gcc ggc atc gat gat cta ccg gtt ttt gtg aag ttt ggc agt att ctt	2496
Ala Gly Ile Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Phe Gly Ser Ile Leu	
820 825 830	

6/14

ccg atg aat ttg aac gcg caa tat caa gtg ggc ggg acc att ggc aac	2544
Pro Met Asn Leu Asn Ala Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr Ile Gly Asn	
835 840 845	
agc ttg acg agc tac acg aat ctc gcg ttc cgc att tat ccg ctt ggg	2592
Ser Leu Thr Ser Tyr Thr Asn Leu Ala Phe Arg Ile Tyr Pro Leu Gly	
850 855 860	
aca aca acg tac gac tgg aat gat gat att ggc ggt tgc gtg aaa acc	2640
Thr Thr Thr Tyr Asp Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser Val Lys Thr	
865 870 875 880	
ata act tct aca gag caa tat ggg ttg aat aaa gaa acc gtg act gtt	2688
Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr Val Thr Val	
885 890 895	
cca gcg att aat tct acc aag aca ttg caa gtg ttt acg act aag cct	2736
Pro Ala Ile Asn Ser Thr Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr Thr Lys Pro	
900 905 910	
tcc tct gta acg gtg ggt ggt tct gtg atg aca gag tac agt act tta	2784
Ser Ser Val Thr Val Gly Gly Ser Val Met Thr Glu Tyr Ser Thr Leu	
915 920 925	
act gcc cta acg gga gcg tgc aca ggc tgg tac tat gat act gta cag	2832
Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Thr Gly Trp Tyr Tyr Asp Thr Val Gln	
930 935 940	
aaa ttc act tac gtc aag ctt ggt tca agt gca tct gct caa tcc gtt	2880
Lys Phe Thr Tyr Val Lys Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ala Gln Ser Val	
945 950 955 960	
gtg cta aat ggc gtt aat aag gtg gaa tat gaa gca gaa ttc ggc gtg	2928
Val Leu Asn Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Val	
965 970 975	
caa agc ggc gtt tca acg aac acg aac cat gca ggt tat act ggt aca	2976
Gln Ser Gly Val Ser Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr Thr Gly Thr	
980 985 990	
gga ttt gtg gac ggc ttt gag act ctt gga gac aat gtt gct ttt gat	3024
Gly Phe Val Asp Gly Phe Glu Thr Leu Gly Asp Asn Val Ala Phe Asp	
995 1000 1005	
gtt tcc gtc aaa gcc gca ggt act tat acg atg aag gtt cgg tat tca	3072
Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Met Lys Val Arg Tyr Ser	
1010 1015 1020	

7/14

```

tcc ggt gca ggc aat ggc tca aga gcc atc tat gig aat aac acc aaa 3120
Ser Gly Ala Gly Asn Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn Asn Thr Lys
1025          1030          1035          1040
gtg acg gac ctt gcc ttg ccg caa aca aca agc tgg gat aca tgg ggg 3168
Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Gln Thr Thr Ser Trp Asp Thr Trp Gly
          1045          1050          1055
act gct acg ttt agc gtc tcg ctg agt aca ggt ctc aac acg gtg aaa 3216
Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Leu Ser Thr Gly Leu Asn Thr Val Lys
          1060          1065          1070
gtc agc tat gat ggt acc agt tca ctt ggc att aat ttc gat aac atc 3264
Val Ser Tyr Asp Gly Thr Ser Ser Leu Gly Ile Asn Phe Asp Asn Ile
          1075          1080          1085
gcg att gta gag caa taa 3282
Ala Ile Val Glu Gln
          1090

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3855

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)... (3855)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (1)... (105)

&lt;400&gt; 2

```

atg cgt cca cca aac aaa gaa att cca cgt att ctt gct ttt ttt aca 48
Met Arg Pro Pro Asn Lys Glu Ile Pro Arg Ile Leu Ala Phe Phe Thr
1          5          10          15
gcg ttt acg ttg ttt ggt tca acc ctt gcc ttg ctt cct gct ccg cct 96
Ala Phe Thr Leu Phe Gly Ser Thr Leu Ala Leu Leu Pro Ala Pro Pro
          20          25          30

```

8/14

gcg cat gcc tat gtc agc agc cta gga aat ctc att tct tcg agt gtc	144
Ala His Ala Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile Ser Ser Ser Val	
35 40 45	
acc gga gat acc ttg acg cta act gtt gat aac ggt gcg gag ccg agt	192
Thr Gly Asp Thr Leu Thr Leu Thr Val Asp Asn Gly Ala Glu Pro Ser	
50 55 60	
gat gac ctc ttg att gtt caa gcg gtg caa aac ggt att ttg aag gig	240
Asp Asp Leu Leu Ile Val Gln Ala Val Gln Asn Gly Ile Leu Lys Val	
65 70 75 80	
gat tat cgt cca aat agc ata acg ccg agc gcg aag acg ccg atg ctg	288
Asp Tyr Arg Pro Asn Ser Ile Thr Pro Ser Ala Lys Thr Pro Met Leu	
85 90 95	
gat ccg aac aaa act tgg tca gct gta gga gct acg att aat acg aca	336
Asp Pro Asn Lys Thr Trp Ser Ala Val Gly Ala Thr Ile Asn Thr Thr	
100 105 110	
gcc aat cca atg acc atc acg act tcc aat atg aag att gag att acc	384
Ala Asn Pro Met Thr Ile Thr Thr Ser Asn Met Lys Ile Glu Ile Thr	
115 120 125	
aag aat cca gta cga atg acg gtc aag aag gcg gac ggc act acg cta	432
Lys Asn Pro Val Arg Met Thr Val Lys Lys Ala Asp Gly Thr Thr Leu	
130 135 140	
ttc tgg gaa cca tca ggc gga ggg gta ttc tca gac ggt gtg cgc ttc	480
Phe Trp Glu Pro Ser Gly Gly Gly Val Phe Ser Asp Gly Val Arg Phe	
145 150 155 160	
ctt cat gcc aca ggg gat aat atg tat ggc atc cgg agc ttc aat gct	528
Leu His Ala Thr Gly Asp Asn Met Tyr Gly Ile Arg Ser Phe Asn Ala	
165 170 175	
ttt gat agc ggg ggt gac ctg ctg cgg aat tcg tcc aat cat gcc gcc	576
Phe Asp Ser Gly Gly Asp Leu Leu Arg Asn Ser Ser Asn His Ala Ala	
180 185 190	
cat gcg ggt gaa cag gga gat tcc ggt ggt ccg ctt att tgg agt acg	624
His Ala Gly Glu Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Trp Ser Thr	
195 200 205	
gca gga tat gga cta tta gtc gat agc gat ggc ggc tac ccc tat aca	672
Ala Gly Tyr Gly Leu Leu Val Asp Ser Asp Gly Gly Tyr Pro Tyr Thr	
210 215 220	

9 / 14

gat	agc	aca	acc	ggt	caa	atg	gag	ttt	tat	tat	ggt	ggg	acc	cct	cct	720
Asp	Ser	Thr	Thr	Gly	Gln	Met	Glu	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Pro	Pro	
225				230				235					240			
gag	gga	cgt	cgt	tat	gcg	aaa	caa	aac	gtg	gaa	tat	tat	att	atg	ctc	768
Glu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ala	Lys	Gln	Asn	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Met	Leu	
				245				250					255			
gga	acc	ccc	aag	gaa	att	atg	acc	gac	gta	ggg	gaa	atc	aca	ggg	aaa	816
Gly	Thr	Pro	Lys	Glu	Ile	Met	Thr	Asp	Val	Gly	Glu	Ile	Thr	Gly	Lys	
			260					265					270			
ccg	cct	atg	ctg	cct	aag	tgg	tcg	ctt	gga	ttc	atg	aac	ttt	gag	tgg	864
Pro	Pro	Met	Leu	Pro	Lys	Trp	Ser	Leu	Gly	Phe	Met	Asn	Phe	Glu	Trp	
		275						280					285			
gat	acg	aat	caa	acg	gag	ttt	acg	aat	aat	gtg	gat	acg	tat	cgt	gcc	912
Asp	Thr	Asn	Gln	Thr	Glu	Phe	Thr	Asn	Asn	Val	Asp	Thr	Tyr	Arg	Ala	
	290							295					300			
aaa	aat	atc	ccc	ata	gat	gct	tac	gcc	ttc	gac	tat	gac	tgg	aaa	aag	960
Lys	Asn	Ile	Pro	Ile	Asp	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	Tyr	Asp	Trp	Lys	Lys	
305				310						315				320		
tac	ggg	gaa	acc	aac	tat	ggt	gaa	ttc	gcg	igg	aat	acg	act	aat	ttc	1008
Tyr	Gly	Glu	Thr	Asn	Tyr	Gly	Glu	Phe	Ala	Trp	Asn	Thr	Thr	Asn	Phe	
				325				330					335			
cct	tct	gcg	tca	acg	act	tct	tta	aag	tca	aca	atg	gat	gct	aaa	ggc	1056
Pro	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Lys	Gly	
		340						345					350			
atc	aaa	atg	atc	gga	att	aca	aaa	ccc	cgc	atc	gtt	acg	aag	gat	gct	1104
Ile	Lys	Met	Ile	Gly	Ile	Thr	Lys	Pro	Arg	Ile	Val	Thr	Lys	Asp	Ala	
	355							360					365			
ica	gcg	aat	gtg	acg	acc	caa	ggg	acg	gac	gcg	aca	aat	ggc	ggt	tat	1152
Ser	Ala	Asn	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Asn	Gly	Gly	Tyr	
	370							375					380			
ttt	tat	cca	ggc	cat	aac	gag	tat	cag	gat	tat	ttc	att	ccc	gta	act	1200
Phe	Tyr	Pro	Gly	His	Asn	Glu	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Phe	Ile	Pro	Val	Thr	
385				390						395				400		
gtg	cgt	agt	atc	gat	cct	tac	aat	gct	aac	gaa	cgt	gct	tgg	ttc	tgg	1248
Val	Arg	Ser	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asn	Ala	Asn	Glu	Arg	Ala	Trp	Phe	Trp	
			405					410					415			

10/14

aat cat tcc aca gat gcg ctt aat aaa ggg atc gta ggt tgg tgg aat	1296
Asn His Ser Thr Asp Ala Leu Asn Lys Gly Ile Val Gly Trp Trp Asn	
420 425 430	
gac gag acg gat aaa gta tct tcg ggt gga gcg ita tat tgg ttt ggc	1344
Asp Glu Thr Asp Lys Val Ser Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Trp Phe Gly	
435 440 445	
aat ttc aca aca ggc cac atg tct cag acg atg tac gaa ggg ggg cgg	1393
Asn Phe Thr Thr Gly His Met Ser Gln Thr Met Tyr Glu Gly Gly Arg	
450 455 460	
gct tac acg agt gga gcg cag cgt gtt tgg caa acg gct aga acc ttc	1440
Ala Tyr Thr Ser Gly Ala Gln Arg Val Trp Gln Thr Ala Arg Thr Phe	
465 470 475 480	
tac cca ggt gcc cag cgg tat gcg act acg ctt tgg tct ggc gat att	1488
Tyr Pro Gly Ala Gln Arg Tyr Ala Thr Thr Leu Trp Ser Gly Asp Ile	
485 490 495	
ggc att caa tac aat aaa ggc gaa cgg atc aat tgg gct gcc ggg atg	1536
Gly Ile Gln Tyr Asn Lys Gly Glu Arg Ile Asn Trp Ala Ala Gly Met	
500 505 510	
cag gag caa agg gca gtt atg cta tcc tcc gtg aac aat ggc cag gtg	1584
Gln Glu Gln Arg Ala Val Met Leu Ser Ser Val Asn Asn Gly Gln Val	
515 520 525	
aaa tgg ggc atg gat acc ggc gga ttc aat cag cag gat ggc acg acg	1632
Lys Trp Gly Met Asp Thr Gly Gly Phe Asn Gln Gln Asp Gly Thr Thr	
530 535 540	
aac aat ccg aat ccc gat tta tac gct cgg tgg atg cag ttc agt gcc	1680
Asn Asn Pro Asn Pro Asp Leu Tyr Ala Arg Trp Met Gln Phe Ser Ala	
545 550 555 560	
cta acg cct gtt ttc cga gtg cat ggg aac aac cat cag cag cgc cag	1728
Leu Thr Pro Val Phe Arg Val His Gly Asn Asn His Gln Gln Arg Gln	
565 570 575	
cca tgg tac ttc gga tcg act gcg gag gag gcc tcc aaa gag gca att	1776
Pro Trp Tyr Phe Gly Ser Thr Ala Glu Glu Ala Ser Lys Glu Ala Ile	
580 585 590	
cag ctg cgg tac tcc ctg atc cct tat atg tat gcc tat gag aga agt	1824
Gln Leu Arg Tyr Ser Leu Ile Pro Tyr Met Tyr Ala Tyr Glu Arg Ser	
595 600 605	

11/14

gct tac gag aat ggg aat ggg ctc gtt cgg cca ttg atg caa gcc tat	1872
Ala Tyr Glu Asn Gly Asn Gly Leu Val Arg Pro Leu Met Gln Ala Tyr	
610 615 620	
cca aca gat gcg gcc gtc aaa aat tac acg gat gct tgg atg ttt ggt	1920
Pro Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe Gly	
625 630 635 640	
gac tgg ctg ctg gct gca cct gtg gta gat aaa cag cag acg agt aag	1968
Asp Trp Leu Leu Ala Ala Pro Val Val Asp Lys Gln Gln Thr Ser Lys	
645 650 655	
gat atc tat tta ccg tct ggg tca tgg att gac tat gcg cga ggc aat	2016
Asp Ile Tyr Leu Pro Ser Gly Ser Trp Ile Asp Tyr Ala Arg Gly Asn	
660 665 670	
gca ata act ggc ggt caa acc atc cga tat tcg gtt aat ccg gac acg	2064
Ala Ile Thr Gly Gly Gln Thr Ile Arg Tyr Ser Val Asn Pro Asp Thr	
675 680 685	
ttg aca gac atg cct ctc ttt att aaa aaa ggt gcc att att cca aca	2112
Leu Thr Asp Met Pro Leu Phe Ile Lys Lys Gly Ala Ile Ile Pro Thr	
690 695 700	
cag aaa gtg cag gat tac gta ggg cag gct tcc gtc act tcc gtt gat	2160
Gln Lys Val Gln Asp Tyr Val Gly Gln Ala Ser Val Thr Ser Val Asp	
705 710 715 720	
gtg gat gtg ttt ccg gat acg acg cag tcg agt ttc acg tac tac gat	2208
Val Asp Val Phe Pro Asp Thr Thr Gln Ser Ser Phe Thr Tyr Tyr Asp	
725 730 735	
gat gat ggc gcc agt tat aac tat gag agc ggc act tat ttt aag caa	2256
Asp Asp Gly Ala Ser Tyr Asn Tyr Glu Ser Gly Thr Tyr Phe Lys Gln	
740 745 750	
aat atg act gct cag gat aat ggg tca ggc tcg tta agt ttt act tta	2304
Asn Met Thr Ala Gln Asp Asn Gly Ser Gly Ser Leu Ser Phe Thr Leu	
755 760 765	
gga gca aag agt ggc agt tac acg ccg gct ctc caa tcc tat atc gtt	2352
Gly Ala Lys Ser Gly Ser Tyr Thr Pro Ala Leu Gln Ser Tyr Ile Val	
770 775 780	
aag ctg cac ggt tct gct gga act tct gtt acg aat aac agc gca gct	2400
Lys Leu His Gly Ser Ala Gly Thr Ser Val Thr Asn Asn Ser Ala Ala	
785 790 795 800	

12/14

atg aca tct tat gca agc ttg gaa gca tta aaa gct gct gct ggg gaa	2448
Met Thr Ser Tyr Ala Ser Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala Ala Gly Glu	
805 810 815	
ggc tgg gcg act ggg aag gac att iat ggg gat gtc acc iat gtg aaa	2496
Gly Trp Ala Thr Gly Lys Asp Ile Tyr Gly Asp Val Thr Tyr Val Lys	
820 825 830	
gtg acg gca ggt aca gct tct tct aaa tct att gct gtt aca ggt gtt	2544
Val Thr Ala Gly Thr Ala Ser Ser Lys Ser Ile Ala Val Thr Gly Val	
835 840 845	
gct gcc gtg agc gca act act tcg caa tac gaa gct gag gat gca tcg	2592
Ala Ala Val Ser Ala Thr Thr Ser Gln Tyr Glu Ala Glu Asp Ala Ser	
850 855 860	
cit tct ggc aat tcg gtt gct gca aag gcg tcc ata aac acg aat cat	2640
Leu Ser Gly Asn Ser Val Ala Ala Lys Ala Ser Ile Asn Thr Asn His	
865 870 875 880	
acc gga tat acg gga act gga ttt gla gat ggt ttg ggg aat gat ggc	2688
Thr Gly Tyr Thr Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Leu Gly Asn Asp Gly	
885 890 895	
gct ggt gtc acc ttc tat cca aag gtg aaa act ggc ggt gac tac aat	2736
Ala Gly Val Thr Phe Tyr Pro Lys Val Lys Thr Gly Gly Asp Tyr Asn	
900 905 910	
gtc tcc ttg cgt tat gcg aat gct tca ggc acg gct aag tca gtc agt	2784
Val Ser Leu Arg Tyr Ala Asn Ala Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Ser	
915 920 925	
att ttt gtt aat gga aaa aga gtg aag tcc acc tcg ctc gct aat ctc	2832
Ile Phe Val Asn Gly Lys Arg Val Lys Ser Thr Ser Leu Ala Asn Leu	
930 935 940	
gca aat tgg gac act tgg tct aca caa tct gag aca ctg ccg ttg acg	2880
Ala Asn Trp Asp Thr Trp Ser Thr Gln Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr	
945 950 955 960	
gca ggt gtg aat gtt gtg acc tat aaa tat tac tcc gat gcg gga gat	2928
Ala Gly Val Asn Val Val Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ser Asp Ala Gly Asp	
965 970 975	
aca ggc aat gtt aac atc gac aac atc acg gla cct ttt gcg cca att	2976
Thr Gly Asn Val Asn Ile Asp Asn Ile Thr Val Pro Phe Ala Pro Ile	
980 985 990	



13/14

atc ggt aag tat gaa gca gag agt gct gag ctt tct ggt ggc agc tca 3024  
 Ile Gly Lys Tyr Glu Ala Glu Ser Ala Glu Leu Ser Gly Gly Ser Ser  
 995 1000 1005  
 ttg aac acg aac cat tgg tac tac agt ggt acg gct ttt gta gac ggt 3072  
 Leu Asn Thr Asn His Trp Tyr Tyr Ser Gly Thr Ala Phe Val Asp Gly  
 1010 1015 1020  
 ttg agt gct gta ggc gcg cag gtg aaa tac aac gtg aat gtc cct agc 3120  
 Leu Ser Ala Val Gly Ala Gln Val Lys Tyr Asn Val Asn Val Pro Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 gca gga agt tat cag gta gcg ctg cga tat gcg aat ggc agt gca gcg 3168  
 Ala Gly Ser Tyr Gln Val Ala Leu Arg Tyr Ala Asn Gly Ser Ala Ala  
 1045 1050 1055  
 acg aaa acg ttg agt act tat atc aat gga gcc aag ctg ggg caa acc 3216  
 Thr Lys Thr Leu Ser Thr Tyr Ile Asn Gly Ala Lys Leu Gly Gln Thr  
 1060 1065 1070  
 agt ttt acg agt cct ggt acg aat tgg aat gtt tgg cag gat aat gtg 3264  
 Ser Phe Thr Ser Pro Gly Thr Asn Trp Asn Val Trp Gln Asp Asn Val  
 1075 1080 1085  
 caa acg gtg acg tta aat gca ggg gca aac acg att gcg ttt aaa tac 3312  
 Gln Thr Val Thr Leu Asn Ala Gly Ala Asn Thr Ile Ala Phe Lys Tyr  
 1090 1095 1100  
 gac gcc gct gac agc ggg aac atc aac gta gat cgt ctg ctt ctt tca 3360  
 Asp Ala Ala Asp Ser Gly Asn Ile Asn Val Asp Arg Leu Leu Leu Ser  
 1105 1110 1115 1120  
 act tcg gca gcg gga acg ccg gtt tct gag cag aac ctg cta gac aat 3408  
 Thr Ser Ala Ala Gly Thr Pro Val Ser Glu Gln Asn Leu Leu Asp Asn  
 1125 1130 1135  
 ccc ggt ttc gag cgt gac acg agt caa acc aat aac tgg att gag tgg 3456  
 Pro Gly Phe Glu Arg Asp Thr Ser Gln Thr Asn Asn Trp Ile Glu Trp  
 1140 1145 1150  
 cat cca ggc acg caa gct gtt gct ttt ggc gtt gat agc ggc tca acc 3504  
 His Pro Gly Thr Gln Ala Val Ala Phe Gly Val Asp Ser Gly Ser Thr  
 1155 1160 1165  
 acc aat ccg ccg gaa tcc ccg tgg tcg ggt gat aag cgt gcc tac ttc 3552  
 Thr Asn Pro Pro Glu Ser Pro Trp Ser Gly Asp Lys Arg Ala Tyr Phe  
 1170 1175 1180

14/14

```

ttt gca gca ggt gcc tat caa caa agc atc cat caa acc att agt gtt 3600
Phe Ala Ala Gly Ala Tyr Gln Gln Ser Ile His Gln Thr Ile Ser Val
1185          1190          1195          1200
cct gtt aat aat gta aaa tac aaa ttt gaa gcc tgg gtc cgc atg aag 3648
Pro Val Asn Asn Val Lys Tyr Lys Phe Glu Ala Trp Val Arg Met Lys
          1205          1210          1215
aat acg acg ccg acg acg gca aga gcc gaa att caa aac tat ggc gga 3696
Asn Thr Thr Pro Thr Thr Ala Arg Ala Glu Ile Gln Asn Tyr Gly Gly
          1220          1225          1230
tca gcc att tat gcg aac ata agt aac agc ggt gtt tgg aaa tat atc 3744
Ser Ala Ile Tyr Ala Asn Ile Ser Asn Ser Gly Val Trp Lys Tyr Ile
          1235          1240          1245
agc gta agt gat att atg gtg acc aat ggt cag ata gat gtt gga ttt 3792
Ser Val Ser Asp Ile Met Val Thr Asn Gly Gln Ile Asp Val Gly Phe
          1250          1255          1260
tac gtg gat tca cct ggt gga act acg ctt cac att gat gat gtg cgc 3840
Tyr Val Asp Ser Pro Gly Gly Thr Thr Leu His Ile Asp Asp Val Arg
1265          1270          1275          1280
gta acc aaa caa taa 3855
Val Thr Lys Gln

```

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02213

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), RESISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 02/10361 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyuujo), 07 February, 2002 (07.02.02), (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.136:163295	1-29
P, A	WO 01/90338 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyuujo), 29 November, 2001 (29.11.01), (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.136:2254	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 May, 2002 (15.05.02)	Date of mailing of the international search report 28 May, 2002 (28.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02213

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5786196 A (The United States of America as Represented by The Secretary of Agriculture), 28 July, 1998 (28.07.98), & US 5889179 A & US 5888776 A	1-29

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), RESISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO 02/10361 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJYO) 2002. 02. 07 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 136:163295	1-29
PA	WO 01/90338 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJYO) 2001. 11. 29 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 136:2254	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	15. 05. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信
		4 C 9 4 5 5 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5786196 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 1998.07.28 & US 5889179 A & US 5888776 A	1-29